ORGANISATION UND FUNKTIONALE SEQUENZELEMENTE DER 5'EXTERNEN RIBOSOMALEN SPACERREGION DER MUNG-BOHNE (VIGNA RADIATA)

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

JUTTA GERSTNER
aus Stuttgart

1987

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543904_0032

ORGANISATION UND FUNKTIONALE SEQUENZELEMENTE DER 5'EXTERNEN RIBOSOMALEN SPACERREGION DER MUNG-BOHNE (VIGNA RADIATA)

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

JUTTA GERSTNER
aus Stuttgart

1987

Tag der mündlichen Prüfung: 6.8.1987

Dekan:	Professor Dr. W. Engels
1. Berichterstatter:	Professor Dr. V. Hemleben
2. Berichterstatter:	Professor Dr. W. Seyffert

Bei Frau Prof. Dr. Vera Hemleben bedanke ich mich für die Überlassung des Themas und die engagierte wissenschaftliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Frau Dipl.Biol. Katrin Schiebel danke ich für die gute praktische Zusammenarbeit, vor allem bei den Sequenzierungs-Experimenten.

Bei Herrn Dipl.Biol. Ramon A. Torres bedanke ich mich für viele anregende Diskussionen und auch für praktische Unterstützung.

Den heutigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe gilt mein Dank für die freundliche Atmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft.

Michael Gerstner danke ich für die geduldige Einführung in den Umgang mit elektronischer Datenverarbeitung und die freundliche Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Nicht zuletzt bedanke ich mich für ein Promotionsstipendium der Graduiertenforderung von 1984-1986.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	31
2.2.	Isolierung von DNS und RNS	31
2.2.1.	Anzucht der Keimlinge	31
2.2.2.	DNS-Isolierung	31
2.2.2.1.	Actinomycin D-CsCl-Gradienten zur Isolierung von rDNS	31
2.2.3.	RNS-Isolierung	32
2.2.3.2.	Isolierung von Gesamtkern-RNS	32
2.2.3.2.	Isolierung von ribosomaler RNS	32
2.3.	Chromatin-Isolierung	32
2.3.1.	Verdau von Chromatin-Präparationen mit Micrococcus-Nuklease bzw. DNase I	33
2.3.2.	Weiterbehandlung der Nuklease-verdauten Chromatin-Proben	33
2.4.	Charakterisierung von DNS	34
2.4.1.	Restriktionsenzym-Abbauten	34
2.4.2.	Agarosegele und Transfer auf Nitrocellulose-Filter	34
2.4.3.	Polyacrylamid-Gele	34
2.5.	Charakterisierung von RNS	35
2.5.1.	Auftrennung und Analyse von RNS	35
2.5.2.	Analyse von RNS-Molekülen auf Formaldehyd-Agarosegelen und Northern-Transfer	35
2.6.	Elutionstechniken	36

2.6.1.	Elution aus Agarosegelen	36
2.6.2.	Elution aus Polyacrylamid-Gelen	36
2.7.	Klonierungstechniken	37
2.7.1.	Klonierung in pBR 322	37
2.7.1.1.	Isolierung und Reinigung von Plasmiden	37
2.7.1.2.	Ligation	38
2.7.1.3.	Transformation	38
2.7.2.	Klonierung in M 13-Phagen	39
2.7.2.1.	Vektorisolierung	39
2.7.2.2.	Ligation und Transformation	39
2.7.3.	Miniscreen zur Charakterisierung rekombinanter Plasmide bzw. M 13-Klone	40
2.8.	Markierungs- und Hybridisierungstechniken	40
2.8.1.	Nicktranslation	40
2.8.2.	Hybridisierung mit markierter DNS	40
2.8.3.	Endmarkierung von RNS	41
2.8.4.	Hybridisierung mit endmarkierter RNS	41
2.8.5.	Endmarkierung von DNS-Fragmenten mit Polynukleotid-Kinase	42
2.9.	DNS-Sequenzierung	42
2.9.1.	Template-Isolierung	42
2.9.2.	T-Reaktionen	43
2.9.3.	Sequenzier-Reaktionen	43
2.9.4.	Sequenziergele	44
2.9.5.	Auswertung der Sequenzen	44
2.10.	Kartierung von RNS-Fragmenten mittels S_1-Nuklease und Mung-bean-Nuklease	45

2.10.1.	Hybridisierung in Formamid	45
2.10.2.	Hybridisierung in Na-TCA	45
2.10.3.	Kartierung der RNS-Enden mit S_1-Nuklease bzw. Mung-bean-Nuklease	46
2.11.	Puffer und Lösungen	47
2.12.	Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	56
2.12.1.	Chemikalien	56
2.12.2.	Radioaktiv markierte Substanzen	58
2.12.3.	Enzyme	58
2.12.4.	Verbrauchsmaterialien	59
2.13.	Abkürzungen	60
3.	Ergebnisse	62
3.1.	Feinkartierung des 5`externen Spacers der Mung-Bohne	62
3.2.	DNS-Sequenzierung des 5`externen Spacers	69
3.3.	Versuche zur Bestimmung des Transkriptions-Starts des rRNS-Precursor-Moleküls	85
3.3.1.	Hybridisierung mit Gesamtkern-RNS	85
3.3.2.	Northern-Blots zur Bestimmung der Größe des (der) rRNS-Vorläufer-Moleküls(e)	88
3.3.3.	Versuche zur Bestimmung des Transkriptions-Startpunktes mittels S_1-Mapping und Mapping mit Mung-bean-Nuklease	93
3.4.	Chromatinstruktur der ribosomalen Gene	97
3.4.1.	Nuklease-Sensitivität des ribosomalen Chromatins	97

3.4.2. Untersuchungen zur Chromatin-Verpackung verschiedener Bereiche der rDNS-Repetitionseinheit 99

4. Diskussion 104

5. Zusammenfassung 132

6. Literatur 134

1. Einleitung

Die ribosomale RNS, 18S, 25S-28S, 5,8S und 5S rRNS, ist ein wichtiger struktureller und funktioneller Bestandteil der eukaryontischen Ribosomen. Diese Organellen sind für die Proteinbiosynthese verantwortlich, es fällt ihnen und damit auch der ribosomalen RNS eine zentrale Rolle in der Existenz der Zelle zu.

Die Gene für die ribosomale RNS (rRNS) liegen bei den meisten Organismen in mehreren Kopien vor, wobei ihre Anzahl sich im allgemeinen mit der evolutionären Zunahme des DNS-Gehaltes/haploides Genom erhöht. Bei Bakterien findet man 5-10 Kopien der Gene für die ribosomale RNS, bei niederen Eukaryonten einige wenige, bei höheren Eukaryonten liegt die Anzahl der ribosomalen Gene zwischen 100 und 1000 bei Tieren und bis zu über 10 000 rRNS-Genen bei höheren Pflanzen.

In den meisten Eukaryonten liegen die Gene für die 18S, die 5,8S sowie für die 25-28S rRNS, die als rDNS bezeichnet werden, geklustert an bestimmten Loci auf einem oder mehreren Chromosomen vor. Diese Loci bilden die Nukleolus-Organisator-Region, an der im Interphase-Kern der Nukleolus gebildet wird. Die Gene für die 5S rRNS liegen bei höheren Eukaryonten an anderer Stelle im Genom. Im Nukleolus wird die rDNS transkribiert und das rRNS-Precursor-Molekül unmittelbar nach der Transkription prozessiert, die reife rRNS lagert sich mit ribosomalen Proteinen zu Ribonukleoproteinpartikeln zusammen, aus denen schließlich die fertigen Ribosomen entstehen.

Die Anzahl der Nukleolus-Organisator-Regionen (NOR) variiert von Organismus zu Organismus. Bei Saccharomyces findet man 140-150 rDNS-Kopien, die hier auch das Gen für die 5S rRNS enthalten, weitgehend auf einem Chromosom (Philippsen et al., 1978), bei höheren Organismen sind die rRNS-Gene oft auf mehrere Chromosomen verteilt. Bei Drosophila liegen sie auf dem X- und Y-Chromosom (Ritossa u. Spiegelman, 1965). Xenopus besitzt nur einen NOR/haploides Genom (Pardue, 1973), während beim Menschen die rDNS auf fünf Chromosomen verteilt ist (Henderson, 1972). Beim Mais liegen 5000-23 000 Kopien der rDNS auf Chromosom 6 geklustert vor (Phillips et al., 1971), bei Phaseolus coccineus sind die rRNS-Gene auf drei Chromosomen (I, II und V) verteilt (Frediani et al., 1986). Ebenfalls drei Chromosomen mit rRNS-Genen wurden beim Weizen gefunden, zwei Hauptloci auf den Chromosomen 1B und 6B, sowie ein Nebenlocus auf Chromosom 5D (Appels et al., 1980).

Bei einigen niederen, einzelligen Eukaryonten, die über einen "genetischen" Mikronukleus und einen Stoffwechselkern, den Makronukleus, verfügen, findet man in diesem Stoffwechselkern eine Anreicherung extrachromosomaler rDNS. Ein Beispiel ist Tetrahymena pyriformis (Karrer u. Gall, 1976). Auch bei Physarum polycephalum (Campell et al., 1979) und Dictyostelium discoideum (Cockburn et al., 1978) liegen extrachromosomale rDNS-Kopien vor. Eine weitere Möglichkeit des extrachromosomalen Vorkommens der rDNS ist die Amplifikation dieser Gene während der Oogenese von Amphibien (Brown u. Dawid, 1968) und einigen Insekten (Trendelenburg et

al., 1976). Hierbei wird im Pachytän der Meiose eine bestimmte Auswahl der rDNS-Repetitionseinheiten, die von Oozyte zu Oozyte variieren kann, massiv amplifiziert. Die rDNS-Menge kann sich dabei, zum Beispiel bei Xenopus, bis auf das 1000-2000fache der im haploiden Genom vorhandenen Menge steigern (Perkowska et al., 1968). Unklar ist bei der rDNS-Amplifikation immer noch, ob das erste extrachromosomale rDNS-Molekül selektiv aus dem Genom herausgeschnitten wird oder ob die Ausgangsmatrizen für die Amplifikation selektiv repliziert werden. In jedem Fall wird nicht nur eine Ausgangsmatrize verwendet, sondern man findet in der amplifizierten rDNS verschiedene längenheterogene Repetitionseinheiten (Scheer et al., 1977). Für die Transkription der ersten rDNS-Moleküle wird ein Rolling-circle-ähnlicher Mechanismus angenommen (Buongiorno-Nardelli et al., 1976).

Wie bereits erwähnt, liegen die rRNS-Gene in zahlreichen Kopien vor, die tandemartig hintereinander gelagert sind. Die einzelnen rDNS-Transkriptionseinheiten sind durch nicht-transkribierte Spacer-Bereiche (NTS) getrennt. Den Aufbau einer solchen rDNS-Repetitionseinheit zeigt Abb. 1. Sie besteht aus dem 5`externen transkribierten Spacer (ETS), dem Gen für die 18S rRNS, dem internen transkribierten Spacer (ITS) mit dem Gen für die 5,8S rRNS, dem für die 25-28S rRNS codierenden Bereich sowie dem 3`ETS. Diese Anordnung der rDNS-Repetitionseinheiten ist in der Evolution weitgehend konserviert.

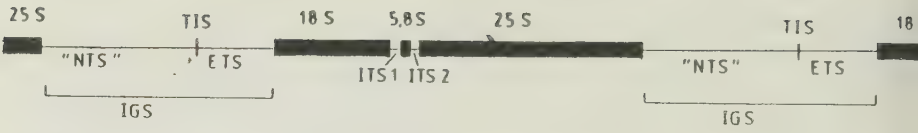


Abb. 1: Schematische Darstellung einer rDNS-Repetitionseinheit von höheren Eukaryonten.
NTS: Nicht-transkribierter Spacer
ETS: Extern transkribierter Spacer
ITS: Intern transkribierter Spacer
IGS: Intergener Spacer
TIS: Transkriptionsinitiations-Stelle

Auch bei Bakterien (Nomura et al., 1984) und bei den rRNS-Genen von Organellen (Dawid et al., 1976; Whitfeld u. Bottomly, 1983) zeigt sich dieser Aufbau; allerdings fehlt ein eigenständiges Gen für die 5,8S rRNS im ITS, da bei Prokaryonten und in Organellen das 5`Ende der 23S rRNS der 5,8S rRNS entspricht (Tague u. Gerbi, 1984). Außerdem gehört das Gen für die 5S rRNS zur rDNS-Transkriptionseinheit und liegt im Anschluß an den für die 23S rRNS codierenden Bereich.

Unterschiede finden sich aber bezüglich der Größe sowohl der Transkriptionseinheit (ohne NTS), die bei Tieren gewöhnlich größer ist (ca. 8-13 kbp) als bei Pflanzen (ca. 6-10 kbp), als auch der gesamten rDNS Repetitionseinheit (einschließlich NTS). Hier zeigt sich ein weitgespannter Variationsbereich sowohl bei Tieren als auch bei Pflanzen. Auch in diesem Fall

ist die tierische rDNS-Repetitionseinheit im allgemeinen größer als die pflanzliche. Ihre Größe reicht bei Tieren von 11 kbp (ohne Intron im 26S rRNS-Gen) bis 17 kbp (mit Intron im 26S rRNS-Gen) bei Drosophila (Wellauer u. Dawid, 1977), 10 bis 16 kbp bei Xenopus (Wellauer et al., 1974) bis zu 30 bis 45 kbp bei Säugern (Arnheim u. Southern, 1977). Bei Pflanzen findet man die kleinsten Repetitionseinheiten mit ca. 8 bis 9 kbp bei der Sojabohne (Friedrich et al., 1979; Varsanyi-Breiner et al., 1979) sowie bei verschiedenen Getreidearten mit 9 bis 10 kbp (Appels et al., 1980). Die größten rRNS-Geneinheiten besitzen die Monokotyledonen Trillium und Paris mit 14 bis 17 kbp (Yakura et al., 1983).

Die rDNS-Repetitionseinheit bei Saccharomyces (ca. 8 kbp) beinhaltet im Gegensatz zu der anderer Eukaryonten noch das Gen für die 5S rRNS, das allerdings vom Gegenstrang abgelesen wird. Dies zeigt, daß es sich trotz der Anordnung gemeinsam mit den anderen rRNS-Genen auch bei Saccharomyces um eine separate 5S rRNS-Transkriptionseinheit handelt (Kramer et al., 1978).

Ein weiteres Charakteristikum eukaryontischer rDNS-Repetitionseinheiten ist ihre Längenheterogenität, die auch innerhalb eines Organismus auftritt. Da die codierenden Sequenzen aufgrund ihrer wichtigen Funktion beim Aufbau der Ribosomen und der Bindung von an der Translation beteiligten Faktoren innerhalb der Evolution sehr stark konserviert sind, ist die erwähnte Heterogenität meist im Spacer-Bereich lokalisiert. Der in Abb. 1 als NTS bezeichnete Bereich der

rDNS-Repetitionseinheit wird in vielen Organismen zumindest teilweise durch die vielfache Wiederholung eines oder mehrerer Sequenzelemente aufgebaut. Oft sind auch mehrere Elemente auf komplizierte Weise ineinander verschachtelt.

Am besten untersucht ist bisher der rDNS-Spacer-Bereich von Xenopus laevis, der aus drei verschiedenen Regionen besteht, die jeweils aus einem bestimmten repetitiven Element aufgebaut sind: Region 0 mit drei repetitiven Elementen, Region I mit acht repetitiven Elementen und eine Region mit 60/81 bp-Elementen, die noch zusätzlich einen duplizierten Promotor enthält, der als "Bam-Island" bezeichnet wird. Diese Region von ca. 1 kbp Länge kann zwei- bis sechsfach im rDNS-Spacer vorhanden sein und damit zu einer starken Längenheterogenität führen (Boseley et al., 1979: Abb. 2).

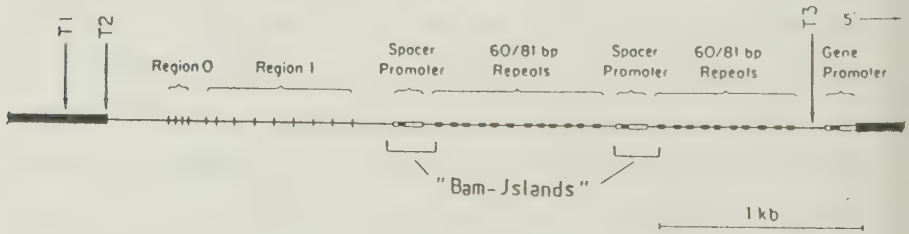


Abb. 2: Darstellung der Spacerorganisation in der rDNS von Xenopus laevis (nach Labhart u. Reeder, 1986, verändert).
Die schwarzen Boxen entsprechen dem Precursor-start und -ende.
T_1 - $T_{5'}$ Terminator-Regionen

Auch die Spacer-Region von Drosophila melanogaster ist aus drei verschiedenen repetitiven Elementen von 90 bp, 240 bp und 340 bp Länge aufgebaut, die jeweils geklustert drei Regionen des NTS bilden (Coen u. Dover, 1982). Bei Chironomus thummi wird die Längenheterogenität des rDNS-Spacers durch eine unterschiedliche Anzahl von repetitiven 120 bp-Cla I-Elementen bedingt (Schmidt et al., 1982). Die unterschiedliche Kopienzahl eines 135 bp langen repetitiven Elementes verursacht eine längenvariable Region im rDNS-Spacer der Maus (Arnheim u. Kuehn, 1979).

Auch bei Pflanzen finden sich viele Beispiele für rDNS-Längenvarianten durch repetitive Elemente im Spacer. Bei Vicia faba beruht die Längenheterogenität auf der unterschiedlichen Anzahl eines 325 bp-repetitiven Elementes, das wiederum aus einem duplizierten 155 bp-Sequenzelement und einer zusätzlichen 14 bp langen nicht verwandten Sequenz besteht (Yakura et al., 1984). Die rDNS-Längenheterogenität der Erbse (Pisum sativum) wird verursacht durch die unterschiedliche Kopienzahl eines 180 bp-Elementes, das 5 bis 35fach repetiert sein kann (Jorgensen et al., 1987). Bei verschiedenen untersuchten Cucurbitaceen beruht die Längenheterogenität der Spacer-Region nicht auf der unterschiedlichen Anzahl einfacher Sequenzelemente, sondern zeigt ein komplizierteres Muster (Siegel u. Kolacz, 1983; Gänal u. Hemleben, 1986; Kavanagh u. Timmis, 1986; M. Ganal, unveröffentlichte Daten). Dagegen ist wiederum ein Element von 115 bp Länge für die Heterogenität der rDNS-

Repetitionseinheit bei der Gerste verantwortlich (Shagai-Maroof et al., 1984). Beim Weizen existieren zwei unterschiedliche repetitive Elemente: ein 135 bp-Element (Appels u. Dvorak, 1982; Lassner u. Dvorak, 1986) und ein 150 bp-Element (Flavell et al., 1986). Beim Mais handelt es sich um ein mehrfach wiederholtes 200 bp-Sequenzelement (McMullen et al., 1986; Toloczyki u. Feix, 1986). Bei Allium und Raphanus werden Sequenzheterogenitäten im rDNS-Spacer gefunden (Maggini u. Carmona, 1981; Delseny et al., 1983), bei einigen Cucurbitaceen treten zusätzlich zur Längenheterogenität auch Sequenzheterogenitäten auf (Siegel u. Kolacz, 1983). Eine Zusammenfassung der bekannten Daten über pflanzliche rDNS-Repetitionseinheiten liefert der Übersichtsartikel von Hemleben et al. (1987).

Dennoch findet man auch Heterogenitäten im codierenden Bereich der rRNS-Gene. Bei Drosophila weist ein Teil der für die 28S rRNS codierenden Gene eine Insertion auf. Die Größe dieser Insertionen reicht von 0,5 bis 6 kbp; man unterscheidet zwei Gruppen von Intron-Sequenzen, eine Gruppe I, deren Größe 0,5, 1 oder 5 kbp beträgt, sowie eine Gruppe II, die keine Homologie mit den Gruppe I-Introns zeigt (Roiha u. Glover, 1980). Die Insertions-Sequenzen der Gruppe I kommen auch als Tandemduplikationen an anderer Stelle im Genom vor, wobei diese chromozentrisch gelegenen Insertions-Sequenzen von kurzen Abschnitten von für die 28S rRNS codierenden Bereichen flankiert sind. Dies legt die Annahme nahe, daß es sich bei diesen Introns um Transposons handeln

könnte (Kidd u. Glover, 1980). Die Intron-tragenden Gene bei Drosophila sind weitgehend inaktiv und tragen nicht zur Produktion von rRNS bei (Long et al., 1981). Insertions-Sequenzen in den rRNS-Genen findet man auch bei Tetrahymena (Kan u. Gall, 1982) und anderen niederen Eukaryonten, sowie in Hefe-Mitochondrien (Bos et al., 1980) und Chlamydomonas-Chloroplasten (Allet u. Rochaix, 1979). Im Gegensatz zu Drosophila haben in diesen Fällen alle rRNS-Gene diese Introns, die auch mit dem rRNS-Precursor transkribiert und später durch Splicing-Schritte entfernt werden.

Die Gene für die 26-28S, 18S und 5,8S rRNS werden durch die rRNS-Polymerase I transkribiert. Durch S_1-Mapping und Primer-Extension-Experimente konnte der Transkriptionsstart- und -endpunkt des rRNS-Precursors bei einigen Tieren, in letzter Zeit auch bei wenigen Pflanzenarten bestimmt werden. Studien über die Transkriptionsinitiation, -termination sowie über Sequenzen, die für weitere Regulationsfunktionen verantwortlich sind, wurden sowohl in vitro als auch in vivo, bisher allerdings überwiegend bei Tieren, durchgeführt. Als in vitro-System wird entweder ein Zell- oder Kernextrakt verwendet; solche Systeme sind für Hefe (Kempers-Veenstra et al., 1984) und für einige Tiere (Grummt, 1981; Kurl u. Jacob, 1985) etabliert. In-vivo-Systeme sind zum Beispiel die Oozyten von Xenopus, in deren Zellkern eine Mikroinjektion klonierter rDNS-Fragmente möglich ist (Trendelenburg et al., 1978), oder die Transfektion klonierter rDNS-Fragmente in Zellkultur-Zellen (Grummt u. Skinner, 1985; Vance et al.,

1985). In diesen Systemen kann dann jeweils eine Transkription der eingebrachten rDNS-Fragmente beobachtet werden. Da die Transkription der rRNS-Gene durch die Polymerase I sehr artspezifisch zu sein scheint, ist eine speziesübergreifende Benutzung der bestehenden Transkriptions-Systeme nur schwer möglich. Allerdings sprechen neuere Daten dafür, daß die Transkriptions-Maschinerie der Polymerase I in der Evolution doch stärker konserviert ist als bisher angenommen wurde. So wird zum Beispiel Dytiscus-rDNS in Xenopus-Oocyten (Trendelenburg et al., 1978) und klonierte rDNS aus Xenopus in einem Maus-Zellextrakt korrekt transkribiert (Wilkinson u. Sollner-Webb, 1982). Ein endgültiges Urteil über konservierte und weniger konservierte Faktoren bei der Transkription durch die Polymerase I ist bis jetzt noch nicht möglich.

Klonierte rDNS von niederen Eukaryonten und einigen Tierarten wurden in Transkriptions-Systemen getestet. Durch Erzeugen von Mutationen in den rDNS-Templates konnten Bereiche, die für die Transkriptionsinitiation, -termination und auch für Enhancer-Funktionen verantwortlich sind, identifiziert werden. Dabei zeigte sich, daß bei den meisten untersuchten Organismen der rDNS-Promotor-Bereich von etwa -30 bis +20 reicht (+1 ist die Transkriptionsinitiations-Stelle), wobei oft noch Sequenzen 3`wärts dieses Bereiches von Bedeutung sind (Kohorn u. Rae, 1983; Kownin et al., 1985). Bei genaueren Untersuchungen dieses Promotor-Bereiches bei Xenopus und Maus wurde festgestellt, daß ein "Core"-

Promotor von etwa -45 bis +5 ausreicht, um unter optimalen Reaktionsbedingungen die Transkription zu initiieren. Unter stringenteren Reaktionsbedingungen in vitro werden zusätzliche 120 bp einer "Upstream"-Promotor-Region bis ca. -160 für die Transkriptionsinitiation benötigt. Die Autoren dieser Studien gehen davon aus, daß in vivo der gesamte Promotor-Bereich von ca. -165 bis +20 notwendig ist (Sollner-Webb et al., 1983; Miller et al., 1985; Haltiner et al., 1986). Neueste Ergebnisse solcher rDNS-Promotor-Studien beim Menschen und bei Xenopus deuten daraufhin, daß der "Core"-Promotor von -40 bis +5 und die "Upstream"-Region von ca. -110 bis -160 durch einen Bereich von geringerer Relevanz für die Transkriptionsinitiation getrennt werden (Sollner-Webb u. Tower, 1986).

Untersuchungen zur Bildung eines Transkriptionsinitiations-Komplexes erbrachten unterschiedliche Ergebnisse für verschiedene Organismen. Bei Maus, Xenopus (Culotta u. Sollner-Webb, 1985; Tower et al., 1986) und Acanthamoeba (Iida et al., 1985) scheint der beschriebene "Core"-Promotor-Bereich für die Bildung eines stabilen Transkriptionsinitiations-Komplexes auszureichen, wobei die weiter "upstream" gelegenen Promotor-Sequenzen bei der Maus zu einer Stabilisierung dieses Komplexes führen. Bei menschlicher rDNS ist dagegen vermutlich der gesamte Promotor-Bereich an der Formation des Transkriptionsinitiations-Komplexes beteiligt, wobei das "Upstream"-Element für die Spezies-Spezifität verantwortlich zu sein scheint (Miesfeld u. Arnheim, 1984). Allerdings kann

bis jetzt noch nicht abschließend entschieden werden, ob die erwähnten Unterschiede tatsächlich artspezifisch sind oder nur auf unterschiedlichen Reaktionsbedingungen beruhen.

Für Pflanzen existieren bis jetzt nur sehr wenige Untersuchungen zur Festlegung des Transkriptionsstart- und -endpunktes. So wurde für Flachs durch in vivo-Markierung und Northern-Blot ein primäres Transkript von ca. 7 kb Länge identifiziert und der Transkriptionsstart auf ca. 500 bp 5`wärts der für die 18S rRNS codierenden Region festgelegt. Das Ende der 25S rRNS scheint auch dem Transkriptionsende zu entsprechen (Ellis et al., 1983). In letzter Zeit wurde der Transkriptionsstart des rRNS-Precursors auch beim Mais von zwei Autoren durch S_1-Mapping und Primer-Extension identifiziert. Beide Untersuchungen ergaben zwei prominente S_1-Signale bei etwa 830 bp bzw. 530 bp vor dem Beginn der für die 18S rRNS codierenden Region. Beide Autoren gehen davon aus, daß das S_1-Signal bei ca. 830 bp vor der 18S rRNS dem korrekten Transkriptionsstart des primären Transkriptions-Produktes entspricht, während das zweite Signal auf eine Processing-Stelle zurückgeht (McMullen et al., 1986; Toloczyki u. Feix, 1986).

In der älteren Literatur bis etwa 1983 wird angenommen, daß die Termination der Transkription der rDNS direkt hinter der 28S rRNS erfolgt, wobei in der Nähe der Terminationsstelle bei vielen Organismen ein Kluster mehrerer Thymidinreste gefunden wurde (Veldman et al., 1980; Mandal u. Dawid, 1981; Bakken et al., 1982). Außerdem ergibt sich an der

Terminationsstelle vieler untersuchter Organismen die Moglichkeit, eine "Hairpin"-Struktur zu bilden, der ebenfalls Bedeutung für die Termination zugemessen wurde. Diese Strukturen weisen gewisse Homologien mit den Terminationsstellen anderer Polymerasen auf (Sollner-Webb u. Reeder, 1979; Veldman et al., 1980; Kominami et al., 1982). Allerdings wurde auch hier schon angenommen, daß die T-Kluster allein für die Termination nicht ausreichend sind, da auch im ETS der Maus-rDNS lange T-Kluster existieren (Miller u. Sollner-Webb, 1982). Neuere Daten deuten nun darauf hin, daß auch am 3`Ende des rRNS-Precursors längere nicht codierende Bereiche transkribiert werden. Bei der Maus wurde 565 bp nach dem 3`Ende der 28S rRNS ein definierter Terminationspunkt gefunden (Grummt et al., 1985). Als Terminationssignal fungiert ein achtmal repetiertes 18 bp-Sequenzmotiv, das als Sal I-Box bezeichnet wird. Am Wirkungsmechanismus dieses Terminationssignals ist ein transagierender Proteinfaktor beteiligt (Grummt et al., 1986a). Eine nahezu identische Kopie dieses Terminationssignals (T_0) wurde nun auch ca. 170 bp vor der Transkriptionsinitiations-Stelle lokalisiert (Grummt et al., 1986b). Weiterhin stellten die Autoren fest, daß dieses T_0-Sequenzmotiv die Transkription stark stimuliert. Auch Henderson und Sollner-Webb (1986) fanden ein solches "Upstream"-Terminationssignal kurz vor der Transkriptionsinitiations-Stelle der rDNS der Maus. Bei Xenopus zeigen Labhart und Reeder (1986) ein Durchlesen der

Polymerase I bis ca. 215 bp 3`wärts des Promotors, einem als T_{∞} bezeichneten vermutlich echten Terminator. Auch dieses T_{∞}-Element zeigt nach neuesten Erkenntnissen einen stimulatorischen Effekt auf den benachbarten Promotor (McStay u. Reeder, 1986), wobei die Autoren annehmen, daß nicht die Bildung des Transkriptionsinitiations-Komplexes selbst, sondern dessen Stabilität beeinflußt wird. Bei der rDNS von Drosophila melanogaster wird ebenfalls über das Ende der 28S rRNS hinaus in den Spacer-Bereich gelesen, teilweise bis in den Promotor der nächsten Transkriptionseinheit hinein. Ein fester Terminationspunkt scheint nicht zu existieren. Die Autoren diskutieren auch hier einen Enhancer-Effekt für die Transkription der tandemartig arrangierten rRNS-Gene (Tautz u. Dover, 1986). Für einen Wirkungsmechanismus für diese Elemente, die sowohl als Terminator als auch als Transkriptions-Enhancer fungieren, diskutieren die Autoren mehrere Hypothesen: Erstens könnte der gefundene Terminationsfaktor ein multifunktionales Protein sein, das sowohl an der Termination als auch an der Transkriptionsinitiations-Reaktion beteiligt ist; zweitens könnte die Termination zu einer Konformationsänderung der Polymerase I führen, die eine Wechselwirkung mit dem Initiations-Komplex erleichtert und drittens wäre es möglich, daß das "Upstream"-Terminationssignal die Spacer-Transkription beendet ohne die Polymerase von der DNS zu lösen und das Enzym zum benachbarten Promotor verlagert wird. Die biologische Funktion dieser Spacer-Transkription ist noch

unklar. Ein häufiger Erklärungsvorschlag ist, daß dadurch die Polymerase I-Moleküle an der DNS festgehalten werden können und nicht in den Pool freier Enzym-Moleküle verlorengehen. Dies würde zu einer Beschleunigung der Transkription führen, da die Bildung des Transkriptionsinitiations-Komplexes erleichtert wäre, wenn die beteiligten Komponenten an der DNS verbleiben.

Für Pflanzen liegen bisher keine Daten über die Transkriptionstermination vor.

Im Spacer der rDNS verschiedener Organismen werden zwei verschiedene Klassen von funktionalen Elementen gefunden: Einerseits Spacer-Promotoren , die nur in einer Orientierung aktiv sind, und andrerseits Enhancer-Elemente, die unabhängig von Lage und Orientierung die Transkriptionseffizienz steigern. Im Spacer von Xenopus laevis werden Elemente beider Klassen gefunden. Die 60/81 bp-Motive (Abb. 2) haben einen transkriptionssteigernden Effekt und werden aufgrund ihrer Eigenschaften als Enhancer-Elemente angesehen (Labhart u. Reeder, 1984). Zusätzlich zeigt sich eine additive Wirkung dieser Sequenzen, da Templates mit einer großen Anzahl davon nach Injektion in Oocyten mit wesentlich größerer Effizienz transkribiert werden als solche mit nur wenigen 60/81 bp-Elementen (Moss, 1983). Der Mechanismus dieser Enhancer-Funktion ist noch nicht völlig geklärt, aber es gibt einige Hinweise, daß die Bindung von Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen könnte. So wurde in den 60/81 bp-Elementen ein Segment gefunden, daß starke Homologie zu dem Bereich des

rDNS-Promotors aufweist, der in vitro Polymerase I-Transkriptionsfaktoren bindet (Dunaway u. Reeder, 1985). Das rDNS-Enhancer-Element scheint außerdem Polymerase-spezifisch zu sein, da die Transkription von einem Promotor für Polymerase II oder III aus nicht stimuliert wird (Sollner-Webb et al., 1985). Weiterhin werden im Spacer von Xenopus zwei sogenannte Spacer-Promotoren gefunden, die fast vollständig homolog sind mit dem Precursor-RNS-Promotor. Diese Promotoren sind essentiell für eine effektive Stimulation der rRNS-Transkription, da Deletionen in diesem Bereich zu einer dramatischen Reduktion der Transkription führen. Die 60/81 bp-Elemente und die Spacer-Promotoren scheinen bei der Stimulation der rRNS-Transkription eng zusammenzuwirken (DeWinter u. Moss, 1986). Im NTS der rDNS der Ratte wurde in der Region zwischen -286 und -1018 ein Enhancer-ähnliches Element entdeckt, das unabhängig von Entfernung und Orientierung zum Promotor die rRNS-Transkription um das 10 bis 17fache steigert (Cassidy et al., 1986). Die funktionale Region gehört nicht zu dem Teil des NTS, der aus einfachen repetitiven Elementen aufgebaut ist. Die Autoren schließen nicht aus, daß in dieser Region mehrere Enhancer-Elemente liegen könnten. DNS-Sequenzierungs-Daten zeigten nur minimale Homologien mit dem rDNS-Promotor der Ratte, was einen anderen Wirkungsmechanismus als bei den 60/81 bp-Elementen im rDNS-Spacer von Xenopus nahelegt. Durch Proteinbindungs-Studien konnten die Autoren aber zeigen, daß die Funktionsweise der Enhancer-Elemente im NTS der Ratte die

Bindung eines transagierenden Faktors einschließt. Im rDNS-Spacer von Drosophila melanogaster und D. virilis werden kurz vor der Transkriptionsinitiations-Stelle einige tandemartig repetierte Sequenzen gefunden, die Transkription initiieren können, was durch das Auftreten kurzer Spacer-Transkripte gezeigt wurde. Die Autoren schreiben dem rDNS-Spacer aufgrund dieser Promotor-Elemente eine regulatorische Funktion bei der rRNS-Transkription zu (Murtif u. Rae, 1985). Auch bei Hefe findet man im Spacer, der die rRNS-Gene trennt, eine transkriptions-stimulierende Aktivität lokalisiert. Es handelt sich um eine 200 bp-Region, die etwa 2,2 kbp vor der Transkriptionsinitiations-Stelle liegt. Sie stimuliert die rRNS-Transkription zwar unabhängig von der Lage, aber in Abhängigkeit von der Orientierung. Im Gegensatz zum Xenopus-Enhancer haben mehrere solcher 200 bp-Elemente keinen additiven Effekt und die Enhancer-Aktivität kann durch Terminatoren oder andere rDNS-Sequenzen aufgehoben werden (Elion u. Warner, 1984). Die Autoren sehen diese 200 bp-Region als ein im Spacer lokalisiertes Hauptpromotor-Element an.

Beim Weizen postulieren Flavell et al. (1986) eine Enhancerfunktion für die repetitiven Elemente im rDNS-Spacer-Bereich. Hinweise darauf ergeben sich aus dem Verhalten von Hybridpflanzen, die sowohl Chromosomen mit der Nukleolus-Organisator-Region des Weizens als auch von Aegilops umbellulata enthalten. In diesen Pflanzen werden die Weizen-Nukleolus-Organisatoren reprimiert und nur die rRNS-Gene von

Aegilops exprimiert. Diese haben eine längere Spacer-Region und beinhalten daher mehr repetitive Elemente (Martini et al., 1982). Dieses Phänomen zeigt Analogie zur oben beschriebenen Enhancer-Funktion der 60/81 bp-Elemente bei Xenopus, deren stimulierender Effekt ebenfalls mengenabhangig ist. Auch für die repetitiven Elemente beim Weizen nehmen Flavell et al. (1986) die Bindung eines Transkriptionsfaktors an, der entweder die Bildung des Transkriptionskomplexes stimuliert oder die Verlagerung des Transkriptionskomplexes zur Transkriptionsinitiations-Stelle beschleunigt.

Bereits während der Transkription lagert sich das entstehende rRNS-Precursor-Molekül mit spezifischen Proteinen zusammen und wird sofort nach Beendigung der Transkription einem Processing unterzogenn, das schließlich zu den reifen 18S, 5,8S und 25-28S rRNS-Molekülen führt. Der Mechanismus dieses Zurechtschneidens scheint sich bei allen Eukaryonten weitgehend zu gleichen, wenn auch gewisse Unterschiede, sogar innerhalb einer Art, gefunden werden. Abb. 3 zeigt ein allgemein akzeptiertes Schema für das rRNS-Processing höherer Organismen (Crouch u. Bachellerie, 1986). Danach werden zunächst die 5`nicht-codierenden Sequenzen durch einen endonukleolytischen Schritt entfernt und degradiert. Der zweite Processing-Schritt ist nach neueren Erkenntnissen bei der Maus die Abtrennung des 3`nicht-codierenden Bereichs (Gurney, 1985). Danach wird die reife 18S rRNS herausgeschnitten. Der nächste Schritt führt zur Entstehung der reifen 25-28S rRNS, und gleichzeitig wird dadurch der

interne transkribierte Spacer freigesetzt, aus dem in einem weiteren Processing-Schritt die 5,8S rRNS herausgeschnitten wird.

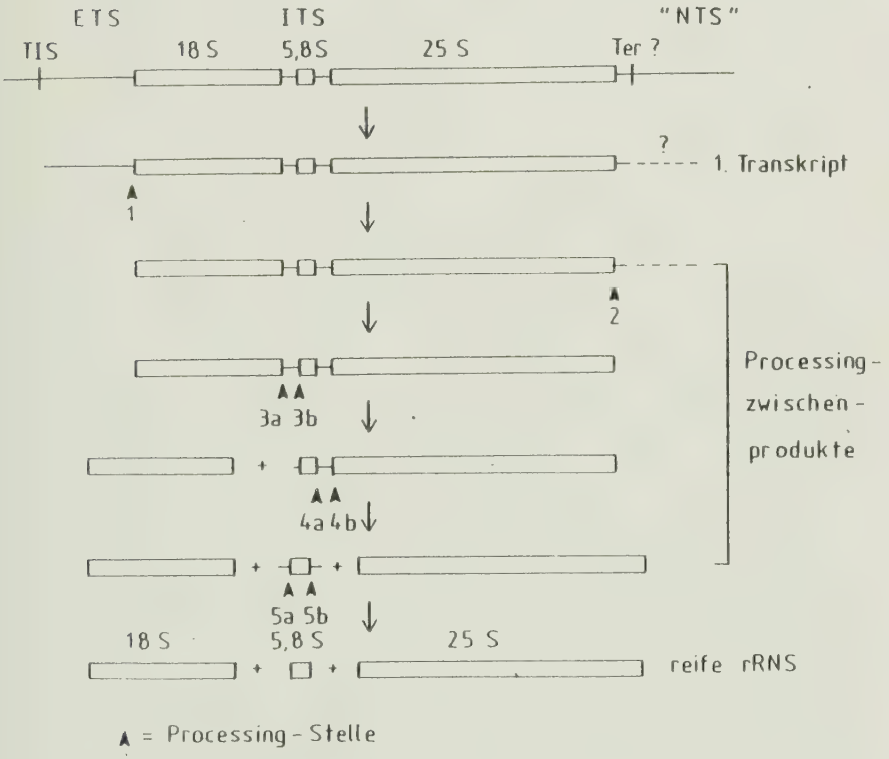


Abb. 3: Schema des Processings des rRNS-Precursor-Moleküls bei höheren Eukaryonten (nach Mandal, 1984, verändert).
Die Zahlen 1 - 5b markieren mögliche Processingstellen.
Ter: Terminator-Region
andere Abkürzungen siehe Abb. 1.

Bei Organismen, deren funktionale rRNS-Gene Introns in der größten rRNS-Art aufweisen, werden diese nun als letzter Schritt herausgespleißt. Dabei wurde gefunden, daß dies bei Tetrahymena durch ein Self-Splicing erfolgt (Cech u. Bass, 1986). Zusätzlich weisen die reifen rRNS-Moleküle Basenmodifikationen wie Methylierungen der Ribose oder Pseudouridin-Reste auf. Auch diese Modifizierungen finden schon während oder kurz nach der Transkription statt, da schon das Precursor-Molekül modifiziert ist. Die Spacer-Regionen weisen keine Methylierungen auf (Maden u. Salim, 1974). Die Verteilung der Methylreste ist nicht zufällig, sondern stark konserviert, oft stärker als die Nukleotidsequenz selbst (Khan et al., 1978). So finden sich sowohl in der 18S als auch in der 25S rRNS stark methylierte Regionen, und Regionen, die deutlich untermethyliert sind (Brand u. Gerbi, 1979). Dieses sehr spezifische Modifikationsmuster legt eine wichtige Funktion dieser Veränderungen beim Processing sowie für Struktur und Funktion der ribosomalen RNS nahe.

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Betrachtung der Gene für die ribosomale RNS ist die Regulation ihrer Transkription. Die meisten Organismen, vor allem aber höhere Pflanzen, besitzen ein Vielfaches ihres Bedarfs an ribosomalen Genen. Es stellt sich daher die Frage, aufgrund welcher Mechanismen ein Teil dieser Gene transkriptionsaktiv ist, während die Mehrheit stillgelegt wird. Außerdem erfolgt

die Regulation der rRNS-Transkription in enger Abstimmung mit der Produktion der ribosomalen Proteine und in Abhängigkeit von der Lebensphase der Zelle.

Als eine Regulationsmöglichkeit kommt die Chromatinstruktur der rRNS-Gene in Frage. Zahlreiche Untersuchungen zu diesem Problem haben gezeigt, daß aktiv transkribiertes Chromatin eine geringere Verpackungsdichte aufweist als inaktives Chromatin. Dies deutet darauf hin, daß Transkription mit einer Auflockerung der Chromatinstruktur einhergeht (Scheer et al., 1977). Bei vielen Organismen wurden bei unterschiedlichen Genen im Bereich der Transkriptionsinitiation DNase I-sensitive Stellen gefunden. Studien bei SV 40 zeigten, daß diese hypersensitiven Regionen von etwa 250 bp Länge nukleosomenfrei sind (Saragosti, 1980). Gleichzeitig bindet dieser als "Gap" bezeichnete Bereich verschiedene zelluläre Proteine, die für die Transkriptionsinitiation von Bedeutung sein könnten (Cereghini et al., 1985). Solche Phänomene wurden auch bei auf Minichromosomen amplifizierten rRNS-Genen von Tetrahymena festgestellt. Auch hier existiert eine nukleosomenfreie Region im Bereich transkribierter rDNS-Sequenzen, die auch DNase I-Sensitivität aufweisen. Zusätzlich findet man hier eine sequenzspezifische Bindung des Enzyms Topoisomerase I, obwohl dieses Enzym sonst keine Sequenzpräferenzen zeigt (Borchsenius et al., 1981; Andersen et al., 1985). Man könnte vermuten, daß diese DNase I-sensitiven Regionen im Bereich der Transkriptionsinitiations-Stelle nur bei aktiv

transkribierten Genen vorhanden ist. Dagegen spricht allerdings die Situation bei Tetrahymena, wo diese Regionen auch in der rDNS stationärer Zellen beobachtet werden, die keine rRNS produzieren. Abweichungen in der Chromatinstruktur der rRNS-Gene in sich bezüglich der rRNS-Expression unterscheidenden Geweben wurden bei Xenopus gefunden (Spadafora u. Riccardi, 1985). Die Autoren beobachteten hier bei wenig aktiven oder inaktiven rRNS-Genen eine Veränderung der elektrophoretischen Mobilität von rDNS-Fragmenten nach Verdau des Chromatins mit verschiedenen Nukleasen. Diese Veränderung beschränkte sich in bezüglich der rRNS-Synthese nur mäßig aktivem Lebergewebe auf die Spacer-Region mit den "Bam-Islands" (Abb. 2). Die Autoren nehmen an, daß diese abweichende Mobilität bestimmter Fragmente auf Einzelstrangschnitte der DNS in einem Teil des Chromatins zurückzuführen ist, das einem Nukleaseabbau besser zugänglich ist. Diese Schnittstellen sind aber nicht oder zumindest nicht vollständig mit Nuklease-hypersensitiven Stellen gleichzusetzen, sondern gehen auf eine unterschiedliche Proteinverpackung der gesamten Gene oder wenigstens größerer Genbereiche zurück.

Bei Pflanzen, bei denen der Überschuß an rRNS-Genen besonders groß ist, liegen zahlreiche cytologische Studien über die Chromatinstruktur dieser Gene vor (Leweke u. Hemleben, 1982). So wurde durch In-Situ-Hybridisierungsexperimente bei verschiedenen Pflanzen festgestellt, daß in der Interphase an einem rRNS-Genlocus

nur ein Teil der Gene als aufgelockertes Chromatin vorliegt, in dem die rRNS-Gene aktiv transkribiert werden. Ein anderer Teil der rDNS kann als stark kondensiertes Heterochromatin zu beiden Seiten des Nukleolus lokalisiert werden (Chouinard, 1974; Ashraf u. Godward, 1985). Außerdem wurden von Stahl (1982) ribosomale Gene in einem Zwischenstadium beobachtet, die zwar als kondensiertes Chromatin vorliegen und nicht transkribiert werden, aber bereits spezifische nukleoläre Proteine gebunden haben und rasch für die Transkription verfügbar gemacht werden können. Diese Gene liegen in den sogenannten fibrillären Zentren. Ihre Anzahl ist abhängig vom Aktivitätszustand der Zellen; aktive Zellen enthalten weniger rRNS-Gene in fibrillären Zentren, wohl weil sie diese in einen aktiven Zustand überführt haben (Deltour et al., 1979).

Ein weiterer Mechanismus, der für die Inaktivierung von rRNS-Genen verantwortlich sein könnte, ist die Methylierung von Cytosin- oder vermutlich seltener von Adeninresten. Bei vielen proteincodierenden Genen wurde bereits eine Korrelation zwischen Expression und einer Untermethylierung der betreffenden Gene festgestellt (Kuo et al., 1979; Shen u. Maniatis, 1980). Die rDNS bei Vertebraten ist größtenteils methyliert, der nicht methylierte Anteil ist im transkribierten Chromatin lokalisiert. Bei Xenopus findet man einen Zusammenhang zwischen einem Verlust an Methylresten in einem Spacer-Bereich und dem Ankurbeln der rRNS-Genaktivität in der Frühentwicklung (Bird et al., 1981). Auch die amplifizierte rDNS ist unmethyliert (Dawid et al., 1970).

Weiterhin läßt sich eine unterschiedliche Verteilung der methylierten Basen in der rRNS-Transkriptionseinheit feststellen. Bei Xenopus sind zwei Regionen im NTS deutlich untermethyliert (Bird et al., 1981). Auch bei einigen Pflanzen sind etwa 30% der Cytosinreste in der rDNS methyliert, was dem Anteil methylierter Cytosinbasen in transkriptionsinaktiven Satelliten bei Cucumis entspricht (Hemleben et al., 1982). Flavell et al. (1983) konnten zeigen, daß die Anzahl voll methylierter CCGG-Stellen bei zunehmender rRNS-Genzahl ansteigt, d.h. abhängig ist von der Anzahl der in der Zelle vorhandenen rRNS-Gene. Außerdem konnten die Autoren anhand von Hybridpflanzen nachweisen, daß die Einführung zusätzlicher Nukleoli zu einer totalen Methylierung der bereits bisher vorhandenen rRNS-Gene führen kann. Die Autoren gehen aufgrund dieser Ergebnisse davon aus, daß "überzählige" rRNS-Gene methyliert und dann auch nicht transkribiert werden. Bei Flachs wurde zusätzlich eine lokal unterschiedliche Verteilung methylierter Cytosinreste in der rDNS gefunden. Das Methylierungsmuster gleicht dem von Xenopus, außer einigen stark methylierten CCGG-Sequenzen am 5`Ende der codierenden Sequenz für das längste Transkript (Ellis et al., 1983). Als Wirkungsweise für die Methylierung wird entweder ein Einfluß auf die Chromatinstruktur, die Verhinderung bzw. Erleichterung einer Bindung bestimmter Proteine an die DNS oder eine Beeinflussung der Bewegung des Transkriptionskomplexes entlang der DNS zur Transkriptionsinitiations-Stelle diskutiert. Außerdem kann

diese DNS-Modifikation und damit möglicherweise auch der Aktivitätszustand eines Gens über mehrere Generationen aufrechterhalten werden (Keshet et al., 1986).

Bei den aktiv transkribierten rRNS-Genen scheint die Verfügbarkeit der aktiven Polymerase I und damit die Transkriptionsinitiations-Rate das wichtigste Regulationselement zu sein. Die Menge der verfügbaren Polymerase I ist eng korreliert mit der Transkriptionsrate der rRNS in vivo. Nach Hemmung der Proteinbiosynthese durch Entzug essentieller Aminosäuren oder durch bestimmte Chemikalien erfolgt eine sehr rasche Inhibierung der rRNS-Synthese, während sich der Spiegel aktiver Polymerase I-Moleküle über viele Stunden nicht verändert. Daraus haben viele Autoren geschlossen, daß die rRNS-Transkription ein zusätzliches kurzlebiges Protein erfordert (Miller u. Sollner-Webb, 1982). Einen Hinweis darauf, daß die Hemmung der rRNS-Synthese in stationären Zellen eher auf Transkriptionsebene als auf Processingebene erfolgt, ergibt die Tatsache, daß diese stationären Zellen weder ein primäres noch ein prozessiertes rDNS-Transkript akkumulieren (Grummt, 1981; Miller u. Sollner-Webb, 1982). Zellextrakte von Zellen, die in vivo keine rRNS synthetisieren, sind auch nicht in der Lage, rDNS-Templates in vitro zu transkribieren (Cavanaugh et al., 1984).

Untersuchungen über die Proteinfaktoren, die bei der rRNS-Transkription eine Rolle spielen, wurden an Zellextrakten von Nagern (Kurl u. Jacob, 1985; Tower et al., 1985), von

menschlichen Zellen (Learned et al., 1985) und von Acanthamoeba (Bateman et al., 1985) durchgeführt. Dabei konnten jeweils zwei Faktoren isoliert werden: Faktor C, vermutlich eine durch kovalente oder andere nicht dissoziierbare Modifikationen aktivierte Form der Polymerase I, und Faktor D, der wahrscheinlich für die Erkennung artspezifischer Sequenzen verantwortlich ist (Miesfeld u. Arnheim, 1984). Außer den Wechselwirkungen zwischen DNS und Proteinen scheinen aber auch Protein/Proteinwechselwirkungen eine Rolle zu spielen, da die Polymerase I nur in Gegenwart des Transkriptionsinitiations-Faktors D (TIF) an die DNS bindet (Bateman et al., 1985). Die oben erwähnten Zellextrakte, die keine rRNS synthetisieren, können durch Zugabe von Faktor C wieder in die Lage versetzt werden, rRNS zu transkribieren (Buttgereit et al., 1985; Tower et al., 1985). Die Mengen von Faktor D und Gesamt-Polymerase I sind in diesen Extrakten normal, während die Menge DNS-gebundener Polymerase I dramatisch reduziert ist. Eine Zugabe dieser erstgenannten Komponenten führt daher auch nicht zu einer Aktivierung der Zellextrakte (Cavanaugh u. Thompson, 1983; Tower et al., 1985). Daraus konnte man schließen, daß die Regulation der rRNS-Transkription über eine Aktivierung bzw. Inaktivierung des Polymerase I-Moleküls erfolgt (Paule et al., 1984). Möglichkeiten dafür wären eine enzymatische Änderung des Phosphorylierungsmusters der Polymerase I (Hirsch u. Martelo, 1976) oder die kovalente Bindung eines zusätzlich aktivierenden Faktors. Vermutlich

wird die rRNS-Transkription durch ein Zusammenspiel zwischen Modifikation der DNS und der beteiligten Proteine reguliert, wobei die Grobregulation eher der DNS zuzukommen scheint, während die Feineinstellung durch die Proteine bewerkstelligt werden könnte.

Auch Stabilität und Processing der rRNS-Transkription könnten bei der Regulation eine Rolle spielen. So nimmt bei Tetrahymena die Processing-Rate im Hunger-Medium dramatisch ab (Eckert u. Kaffenberger, 1980) und auch eine Blockierung der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid in wachsenden Zellen führt zu einem Stop des Processings (Stoyanova u. Hadjiolov, 1979). Da angenommen wird, daß Transkription, Processing und Zusammenlagerung mit ribosomalen Proteinen eng gekoppelte Schritte sind, und außerdem die Synthese von rRNS und ribosomalen Proteinen gemeinsam reguliert wird (Warner, 1977), kommen die ribosomalen Proteine für eine posttranskriptionelle Regulation der rRNS-Synthese bevorzugt in Frage. Ein Mechanismus für dieses Regulationsmodell ist allerdings bisher nicht bekannt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der molekularen Feinstruktur des 5'externen transkribierten und nicht-transkribierten Spacers der rDNS der Mung-Bohne (Vigna radiata). Die Mung-Bohne besitzt mit 0,65 pg DNS/haploidem Genom ein sehr kleines Genom. Der Anteil der rDNS an der Gesamt-DNS beträgt etwa 2,5%, was ca. 1500 Kopien der ribosomalen Gene entspricht (Hemleben, unveröffentlicht). Für die Untersuchung des Spacer-Bereiches wurden Subklone dieser

Region in M13-Phagen hergestellt und deren Sequenz bestimmt. Durch Sequenzvergleiche innerhalb der Spacer-Region und mit den bereits bekannten rDNS Spacern anderer Organismen konnten homologe Motive gefunden werden, deren Bedeutung und Funktion diskutiert wird. Zusätzlich wurde durch Hybridisierungsexperimente sowie durch S_1- und Mung-bean-Nuklease-Mapping versucht, den Transkriptionsstart zu identifizieren. Weitere Versuche galten der Bestimmung der Größe des rRNS-Vorläufer-Moleküls durch Northern-Blots. Außerdem wurden Studien über die Chromatinstruktur der rDNS-Repetitionseinheiten der Mung-Bohne durchgeführt, um Aufschluß über den Einfluß der Chromatinverpackung auf die Transkriptionsaktivität zu erhalten.

2.Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial, Bakterien, Plasmide und Phagen

2.1.1. Pflanzenmaterial

Es wurden Keimlinge der Mung-Bohne (Vigna radiata, früher Phaseolus aureus, Fabaceae) verwendet. Die Samen wurden von Thompson und Morgan, Ipswich, England bzw. über örtliche Reformhäuser bezogen.

2.1.2. Bakterienstamme

Für die Transformation mit Plasmiden und Phagen wurden folgende Bakterienstamme verwendet:

E. coli K12 HB 101 (Boyer u. Roulland-Dussoix, 1969) für pBR 322-Plasmide

E. coli K12 JM 103 (Messing et al., 1981) für M13-Phagen

2.1.3. Plasmide

pBR 322 (Bolivar et al., 1977)

pRV 1-6 (Tab. 1 u. Abb. 4; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dipl. Biol. K. Schiebel)

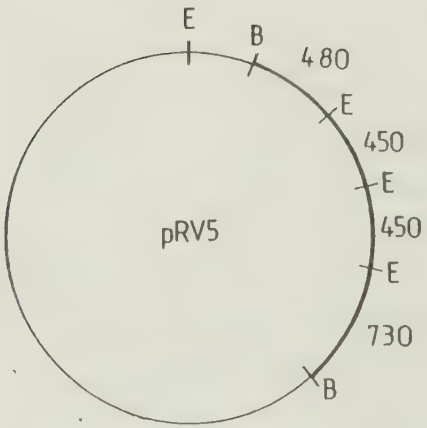
2.1.4. Phagen

M13 mp 8 und M13 mp 9 (Messing u. Vieira, 1982)

M13 mp 18 und M13 mp 19 (Yanisch-Perron et al., 1985)

Klon	Insert	Klonierungs-stellen
pRV 1	10,0 kbp-rDNS-Repetitionseinheit	Hind III
pRV 2	10,5 kbp-rDNS-Repetitionseinheit	Hind III
pRV 3	10,8 kbp-rDNS-Repetitionseinheit	Hind III
pRV 4	1,65 kbp-5`externe Spacerregion	Bam HI
pRV 5	2,1 kbp-5`externe Spacerregion	Bam HI
pRV 6	185 bp-Fragment 5`wärts der hete-rogenen 5`externen Spacerregion	Bam HI/ Hind III

Tab. 1: Übersicht über Inserts und Klonierungsstellen der verwendeten Klone pRV 1 - 6.



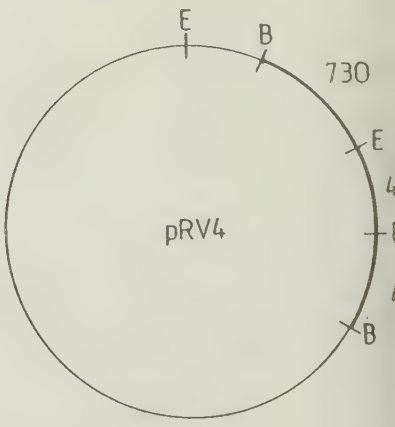


Abb. 4: Restriktionskarte der Klone pRV 4 und pRV 5, die die 5'externe Spacerregion der Mung-Bohne enthalten.
E = Eco RI
B = Bam HI

2.2. Isolierung von DNS und RNS

2.2.1. Anzucht der Keimlinge

Die Samen wurden zunächst 30 min in Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgte eine Oberflächensterilisation in 1%iger Calciumhypochloritlösung für 20 min. Die Samen wurden über Nacht zum Ausquellen in sterilem Wasser geschüttelt und dann in Hydrokultur für 3 bis 4 Tage im Dunkeln angezogen. Bei Pflanzen, die für die RNS- bzw. Chromatinisolierung verwendet wurden, wurden die Pflanzen vor der Aufarbeitung über Nacht ins Licht gestellt.

2.2.2. DNS-Isolierung

Hypokotyl und Primärblätter wurden getrennt aufgearbeitet. Die Isolierung von Gesamt-DNS erfolgte nach Hemleben et al. (1982), allerdings wurde dem Kernisolierungsmedium Triton X-100 in einer Endkonzentration von 0,5% zugesetzt. Die Gesamt-DNS wurde über CsCl-Gradienten gereinigt.

2.2.2.1. Actinomycin D-CsCl-Gradienten zur Isolierung von rDNS

Die Abtrennung der rDNS von der übrigen DNS erfolgte über einen Actinomycin D-CsCl-Gradienten (Hemleben et al., 1977), wobei der Brechungsindex auf 1,390 eingestellt wurde. Nach dem Sammeln der rDNS-Fraktionen wurde das Actinomycin D durch mehrfaches Ausschütteln mit Isoamylalkohol entfernt.

2.2.3. RNS-Isolierung

2.2.3.1. Isolierung von Gesamtkern-RNS

Die Kernisolierung wurde wie bei der DNS-Isolierung beschrieben durchgeführt. Die pelletierten Kerne wurden mit Tris-$MgCl_2$-Puffer gewaschen und anschließend in einem kleinen Volumen Tris-$MgCl_2$-Puffer aufgenommen. Die Nukleinsäuren wurden mit je einem Volumen Phenol:Chloroform und Chloroform:Isoamylalkohol extrahiert und nach Zusatz von 1/10 Volumen 3M Na-Acetat aus der wässrigen Phase ausgefällt. Die Nukleinsäure-Präparation wurde in Tris-$MgCl_2$-Puffer gelöst und mit RNase-freier DNase (0,5 u/µl, Macaloid-inkubiert) für 5 min bei 37°C behandelt.

2.2.3.2. Isolierung von ribosomaler RNS

Die Isolierung der ribosomalen RNS erfolgte nach der von Friedrich et al. (1979) beschriebenen Methode. Die über Saccharosegradienten aufgetrennten ribosomalen RNS-Arten wurden getrennt gesammelt, mit Ethanol ausgefällt und konnten dann zur Endmarkierung eingesetzt werden.

2.3. Chromatin-Isolierung

Die Kernisolierung erfolgte wiederum nach Hemleben et al. (1982). Die pelletierten Kerne wurden dann in Nuklease- bzw. DNase I-Puffer gewaschen und schließlich in 1 bis 1,5 ml des entsprechenden Puffers aufgenommen und Portionen zu je 200 µl aufgeteilt.

2.3.1. Verdau von Chromatin-Präparationen mit Micrococcus-Nuklease bzw. DNase I (Leber u. Hemleben, 1979)

Den einzelnen Chromatin-Portionen wurden 2-4 µl (10 u/µl) Micrococcus-Nuklease bzw. 4 µl (0,1-10 µg/µl) DNase I zugesetzt und unterschiedlich lange (Zeitwerte zwischen 1 min und 30 min) bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 20 µl 20% SDS abgestoppt und die Nukleinsäuren mit einem Volumen Phenol:Chloroform und anschließend mit einem Volumen Chloroform:Isoamylalkohol extrahiert. Daraufhin erfolgte eine Ethanolfällung nach Zusatz von 1/10 Volumen 3M Na-Acetat.

2.3.2. Weiterbehandlung der Nuklease-verdauten Chromatin-Proben

Nach dem Wiederlösen der gefällten Nukleinsäuren in TE-Puffer wurde ein Teil der Proben einem zusätzlichen Restriktionsverdau unterzogen (siehe 2.4.1.). Die nicht nachgeschnittenen Proben wurden auf 2,5%igen Agarosegelen, die mit Restriktionsenzymen nachbehandelten Proben auf 0,7-1%igen Agarosegelen aufgetrennt (siehe 2.4.2.). Die aufgetrennte DNS wurde jeweils auf Nitrocellulose-Filter transferiert (siehe 2.4.2.).

2.4. Charakterisierung von DNS

2.4.1. Restriktionsenzym-Abbauten

Die Abbauten mit Restriktionsenzymen erfolgten entsprechend den Angaben der Hersteller. Es wurden jeweils etwa 10 u Enzym/µg DNS eingesetzt. Bei Doppelabbauten wurde das erste Enzym durch Hitzebehandlung (10 min, 70°C) oder durch Ethanolfällung inaktiviert. Die Reaktionen wurden nach Beendigung der Inkubation durch Zusatz von etwa 1/10 Volumen Stop-Mix abgestoppt. Bei der Analyse kleiner Fragmente wurde ein Stop-Mix ohne Farbstoff verwendet.

2.4.2. Agarosegele und Transfer auf Nitrocellulose-Filter

Je nach Größe der aufzutrennenden DNS-Fragmente wurden Agarose-Konzentrationen zwischen 0,7 und 2,5% in DNS-Elektrophorese-Puffer verwendet. 0,7-1%ige Gele wurden horizontal, 2-2,5%ige Gele vertikal gefahren. Der Transfer der DNS-Fragmente auf Nitrocellulose-Filter erfolgte nach der Methode von Southern (1975).

2.4.3. Polyacrylamid-Gele

Je nach Größe der aufzutrennenden DNS-Fragmente wurden Acrylamid-Konzentrationen von 3,5-15% in DNS-Elektrophorese-Puffer bzw. für Elutionsgele in TBE-Puffer benutzt. Die Gele wurden ausschließlich vertikal gefahren.

2.5. Charakterisierung von RNS

2.5.1. Auftrennung und Analyse von RNS

Die Gesamtkern-RNS wurde teilweise über Saccharosegradienten (Friedrich et al., 1979) gereinigt und die einzelnen Größenfraktionen auf Agarosegelen analysiert. Es wurden horizontale Gele mit einer Agarose-Konzentration von 1,3-1,5% in RNS-Elektrophorese-Puffer verwendet. Die RNS-Proben wurden dazu mit 1/10 Volumen Stop-Mix versetzt.

2.5.2. Analyse von RNS-Molekülen auf Formaldehyd-Agarosegelen und Northern-Transfer (Lehrach et al.,1977)

Es wurden 1,3%ige Agarosegele in MOPS-Puffer und 2,2 M Formaldehyd zur Denaturierung verwendet. Die RNS-Proben (10-20 µg) wurden in 4,5 µl H_2O aufgenommen und nach Zusatz von 2 µl 5xMOPS-Puffer, 3,5 µl Formaldehyd und 10 µl Formamid 15 min bei 55°C denaturiert. Nach Zugabe von 2 µl Ladepuffer wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Es wurden jeweils zwei identische Gelhälften angefertigt, um eine Hälfte für die Färbung und die andere für den Northern-Transfer verwenden zu können. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die zu transferierende Gelhälfte 5 min unter mehrmaligem Wechseln der Flüssigkeit gewässert, dann je 45 min mit einem Denaturierungs- und anschließend mit einem Neutralisierungsmedium behandelt. Darauf folgte eine 1stündige Äquilibrierung in 20xSSC. Der Transfer auf Nitrocellulose-Filter erfolgte analog dem Southern-Transfer.

Die zu färbende Gelhälfte wurde in einer 0,5%igen Toluidinblau-Lösung in 40% Ethanol für 5 min gefärbt und dann für mehrere Stunden in 20% Ethanol unter mehrmaligem Wechsel der Lösung entfärbt.

2.6. Elutionstechniken

2.6.1. Elution aus Agarosegelen

Die DNS-Fragmente wurden durch Elektroelution (McDonnell et al., 1977) aus den Gelen wiedergewonnen. Die Elution wurde in 0,1xTBE bei 250-300 V für 3 h durchgeführt. Vor Beendigung der Elution wurde die Spannung für 5-10 min umgepolt. Das Eluat wurde anschließend über eine mit Watte gestopfte Pipettenspitze zur Entfernung von Agaroseresten abfiltriert und die DNS nach Zusatz von 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat mit zwei Volumen Ethanol ausgefällt.

2.6.2. Elution aus Polyacrylamid-Gelen

Die ausgeschnittenen Banden mit dem zu eluierenden Fragment wurde durch Pressen durch die Kanüle einer Einmal-Spritze homogenisiert. Das Homogenat wurde mit einem Volumen Extraktions-Puffer über Nacht bei 37°C geschüttelt, das Acrylamid abzentrifugiert, mit 1/2 Volumen Extraktions-Puffer nachextrahiert und die wässrigen Überstände vereinigt. Acrylamidreste wurden wiederum durch Filtrieren entfernt und die DNS mit zwei Volumen Ethanol ausgefällt.

2.7. Klonierungstechniken

2.7.1. Klonierung in pBR 322

2.7.1.1. Isolierung und Reinigung von Plasmiden (Birnboim u. Doly, 1979; Birnboim, 1983)

Aus einer E. coli-Vorkultur (LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin wurde 1 l LB-Medium 1:100 angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,3-0,5 hochgezogen. Dann wurden die Plasmide durch Zugabe von 180 µg/ml Chloramphenicol amplifiziert und die Zellen über Nacht weitergeschüttelt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (5 min, 6000 Upm, GSA-Rotor, Sorvall-Zentrifuge) und in 8 ml Lösung I suspendiert. Nach 5-15 min Inkubation bei RT wurden 16 ml Lösung II zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 12 ml Lösung III und 5minütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz 30 min bei 20 000 Upm (SS 34-Rotor, Sorvall-Zentrifuge) abzentrifugiert und der Überstand anschließend 15 min mit 0,1 mg/ml RNase bei RT inkubiert. Es folgte eine Fällung mit zwei Volumen Ethanol. Die Nukleinsauren wurden dann 20 min bei 8000 Upm (GSA-Rotor, Sorvall-Zentrifuge) abzentrifugiert und das Pellet in 7,5 ml TE-Puffer, pH 8 gelöst. Nach Zusatz von 6,8 g CsCl und 350 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) folgte eine Ultrazentrifugation für 48 h bei 34 000 Upm (50 Ti-Rotor, 20°C, Beckman-Zentrifuge). Nach Beendigung der Zentrifugation wurde die Plasmidbande entnommen und in manchen Fällen über einen zweiten CsCl-Ethidiumbromid

Gradienten gereinigt. Das Ethidiumbromid wurde durch mehrmaliges Ausschütteln der entnommenen Plasmidbande mit Isoamylalkohol entfernt. Nach einer Dialyse gegen TE-Puffer, pH 7,5 erfolgte eine Ethanolfällung der gereinigten Plasmid-DNS.

2.7.1.2. Ligation

Die Ligation von mit dem entsprechenden Restriktionsenzym geschnittenen Vektor und den eluierten zu klonierenden DNS-Fragmenten erfolgte in einem Gesamtvolumen von 30-50 µl. Ein typischer Ligationsansatz sah folgendermaßen aus:

100-200 ng Vektor-DNS

2-10facher molarer Überschuß der zu klonierenden DNS

1/10 Volumen 10xLigationspuffer

1/10 Volumen 100 mM DTT

1/10 Volumen 10 mM ATP

1 u Ligase

Die Ligation erfolgte entweder über Nacht, wobei die Temperatur von 14°C auf 8°C abgesenkt wurde, oder für 2 h bei 16°C.

2.7.1.3. Transformation

Die Transformation erfolgte nach der Methode von Dagert und Ehrlich (1979), wobei folgende Modifikationen eingeführt wurden: Die Zellen wurden nach dem Aufnehmen in 1/2 Volumen $CaCl_2$ (30-50 mM) 20 min auf Eis gehalten und nach erneutem Abzentrifugieren in 3ml $CaCl_2$ aufgenommen. Die Plattierung von 300 µl-Aliquots erfolgte auf LB-Platten mit 50 µg/ml

Ampicillin. Rekombinante Plasmide wurden durch "Replica-Plating" auf je eine Platte mit Ampicillin bzw Tetracyclin identifiziert.

2.7.2. Klonierung in M 13-Phagen

2.7.2.1. Vektorisolierung (replikative Form = RF)

Ein blauer Einzelplaque wurde in 5 ml 2xYT-Medium mit 20 µl einer ÜN-Kultur E. coli JM 103 für 6 h stark geschüttelt. Dann wurden die Bakterien abzentrifugiert und der Überstand als Ausgangslysat (10^{12}-10^{13} Phagen/ml) zum Animpfen verwendet. 1 l 2xYT-Medium wurde 1:100 mit einer Vorkultur E. coli JM 103 angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,3-0,4 hochgezogen. Dann wurden die Phagen bis zu einer MOI von 3-10 zugegeben und der Ansatz 3-4 h kräftig geschüttelt. Die Isolierung der replikativen Form der M 13-Phagen erfolgte wie in 2.7.1.1. beschrieben.

2.7.2.2. Ligation und Transformation

Die Ligation und die Präparation kompetenter Zellen wurde wie unter 2.7.1.2. und 2.7.1.3. beschrieben durchgeführt. Die Plattierung des Transformationsansatzes erfolgte nach dem Hitzeschock auf 2xYT-Platten. Dazu wurden 3 ml 2xYT-Weichagar mit 10 µl 100 mM IPTG, 30 µl 2%iger X-Gal-Lösung und 150 µl einer ÜN-Kultur E. coli JM 103 als Indikatorbakterien gemischt und nach Zusatz des Transformationsansatzes ausplattiert. Rekombinante Phagen erzeugen nach 12-16 h Inkubation bei 37°C weiße Plaques.

2.7.3. Miniscreen zur Charakterisierung rekombinanter Plasmid bzw. M 13-Phagen-Klone

Die schnelle Präparation von Plasmid-DNS bzw von RF-M 13-Phagen wurde nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Für die M 13-Phagen wurde der zu untersuchende Einzelplaque mit 30 µl einer E. coli JM 103-ÜN-Kultur in 5 ml 2xYT-Medium für 5-6 h unter heftigem Schütteln angezogen und die pelletierten Bakterien nach der oben erwähnten Methode aufgearbeitet. Die isolierten Nukleinsäuren wurden nach der Fällung und dem Wiederlösen für 15 min einer RNase-Behandlung (100 µg RNase/ml) bei RT unterzogen.

2.8. Markierungs- und Hybridisierungstechniken

2.8.1. Nicktranslation

Die Nicktranslation wurde nach der Methode von Rigby et al. (1977) durchgeführt. Es wurden jeweils 100-200 ng des zu markierenden Fragmentes eingesetzt. Die erreichte spezifische Radioaktivität betrug zwischen 0,5 und $5x10^8$ cpm/µg DNS. Nicht eingebaute Triphosphate wurden über eine Sephadex-G 50-Säule abgetrennt.

2.8.2. Hybridisierung mit markierter DNS

Die Vorhybridisierung erfolgte in 5xSSPE, 4xDenhardt, 0,1% SDS und 200 µg/ml frisch denaturierter Heringssperma-DNS für 3-16 h bei 68°C. Die Hybridisierung wurde in 3xSSPE, 1xDenhardt, 0,1% SDS, 200 µg/ml frisch denaturierter Heringssperma-DNS und der durch Aufkochen denaturierten

markierten DNS-Probe bei 68°C durchgeführt. Die Filter wurden anschließend in 2xSSPE und 0,1% SDS bei 68°C gewaschen und bei -70°C mit einer Verstärkerfolie exponiert (Kodak X-Omat S Röntgenfilm).

2.8.3. Endmarkierung von RNS

Die zu markierende RNS wurde zunächst durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Die in 100 mM Tris, pH 8 gelöste RNS wurde 2 min auf 90°C erhitzt, dann auf Eis abgekühlt. Nach Zusatz von 10 u alkalischer Phosphatase/5 µg RNS wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Um die für die Phosphatase essentiellen Zn^{2+}-Ionen abzufangen, wurde nach Zugabe von 2 µl 100 mM NTA und 10 µl 100 mM Tris, pH 8 30 min bei 50°C inkubiert. Um die Phosphatase zu zerstören, wurde dann wieder 2 min auf 90°C erhitzt und die Probe mit Phenol:Chloroform, Chloroform:Isoamylalkohol und Ether ausgeschüttelt. Die RNS wurde dann mit zwei Volumen Ethanol ausgefällt.

Die Endmarkierung von RNS wurde wie bei Chaconas und van der Sande (1980) beschrieben durchgeführt. Es wurden jeweils 50-100 µCi/5 µg RNS eingesetzt. Die erreichte spezifische Radioaktivität lag zwischen 10^6 und 10^7 cpm/µg RNS. Die Abtrennung nicht eingebauter Triphosphate erfolgte wiederum über eine Sephadex-G 50-Säule.

2.8.4. Hybridisierung mit endmarkierter RNS

Die Hybridisierung erfolgte wie bereits beschrieben (Gerstner, 1983). Zur erneuten Hybridisierung wurden die

Filter nach der Methode von Grunstein und Hogness (1975) abgewaschen.

2.8.5. Endmarkierung von DNS-Fragmenten mit Polynukleotid-Kinase

Die Dephosphorylierung der DNS-Proben erfolgte analog derjenigen der RNS-Proben, allerdings wurden nach der ersten Inkubation mit alkalischer Phosphatase weitere 10 u des Enzyms zugesetzt und die Proben wurden für 30 min bei 56°C weiterinkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase und die Endmarkierung der DNS erfolgte wie in 2.8.3. beschrieben. Nach der Kinase-Reaktion wurde die DNS mit einem Volumen Phenol:Chloroform und anschließend mit einem Volumen Chloroform:Isoamylalkohol ausgeschüttelt, in gebrauchsfertige Portionen aufgeteilt und mit Ethanol gefällt.

2.9. DNS-Sequenzierung (Sanger et al., 1977)

2.9.1. Template-Isolierung

Die Anzucht der Phagen aus Einzelplaques erfolgte wie in 2.7.3. beschrieben. Nach zweimaligem Abzentrifugieren der Bakterien wurde die Einzelstrang-Form (ss-Form) der M 13-Phagen aus dem Überstand isoliert. Dazu wurden 1,4 ml dieses Überstandes mit 200 µl 2,5 M NaCl, 20% PEG 6000 versetzt und 30 min bei RT inkubiert, um die Phagen zu fällen. Die Phagen wurden dann durch einen 15minütige Zentrifugation bei 13 000 Upm (Biofuge) pelletiert und der Überstand vollständig entfernt. Das Pellet wurde in 150 µl TE-Puffer, pH 8 gelöst

und mit 100 µl Phenol extrahiert. Nach Abnehmen der wässrigen Phase wurde das Phenol mit 100 µl TE-Puffer, pH 8 nachextrahiert und die wassrigen Phasen vereinigt. Nach Zusatz von 40 µl 5 M $NaClO_4$ erfolgte eine Fällung mit 100 µl Isopropanol. Die Phagen-DNS wurde dann 15 min bei 13 000 Upm (Biofuge) pelletiert und in 300 µl 0,3 M Na-Acetat gelöst. Nun erfolgte eine Fällung mit 3 Volumen Ethanol. Nach dem Abzentrifugieren der ss-DNS wurde diese mit 96%igem kaltem Ethanol gewaschen und in 15-20 µl H_2O gelöst (Schreier u. Cortese, 1979).

2.9.2. T-Reaktionen

1 µl der Template-DNS-Lösung wurde mit 2 µl Primer-Lösung, 0,4 µl 10xAnnealing-Puffer und 1,35 µl H_2O versetzt und 5 min auf 70°C erhitzt. Dann wurde der Ansatz langsam auf RT abgekuhlt. Nach Zusatz von 2 µl T-Mix erfolgte die eigentliche Sequenzier-Reaktion durch Zugabe von 2 µl Reaktionsmix. Nach 15 min Inkubation bei RT wurden 2 µl Chase-Lösung zugegeben und weitere 15 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 4 µl Formamid-Mix wurde die Reaktion beendet, der Ansatz aufgekocht und 3 µl davon auf ein Sequenziergel aufgetragen (2.9.4.). Die Elektrophorese erfolgte für 1 3/4 h bei 2000 V.

2.9.3. Sequenzier-Reaktionen

4-7,5 µl Template-DNS-Lösung wurden mit 1 µl Primer-Lösung und 1,2 µl 10xAnnealing-Puffer versetzt und mit H_2O auf 10 µl aufgefullt. Der Ansatz wurde wie bei den T-Reaktionen

(2.9.2.) erhitzt und abgekühlt. Je 2µl des Ansatzes wurden auf 4 Eppendorfgefäße verteilt und je 2 µl des entsprechenden Basen-Mixes, (G, A, T, C) zugesetzt. Die eigentlichen Sequenzier-Reaktionen erfolgten wie in 2.9.2. beschrieben.

2.9.4. Sequenziergele

Es wurden 40·cm lange, 30 cm breite und 0,4 mm dicke Gele verwendet, die aus 6% Polyacrylamid, 50% Harnstoff und 1xTBE-Puffer zusammengesetzt waren. Die benutzten Kämme hatten 27 bzw. bei Haifischzahn-Kämmen 49 Taschen. Die Vorelektrophorese wurde für 30 min bei 1500 V, die eigentliche Elektrophorese bei 2000 V durchgeführt. Die Proben wurden jeweils zweimal aufgetragen; der erste Lauf dauerte 4 1/2 h, der zweite 1 3/4 h. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele für 10 min in 10% Essigsäure und 20% Ethanol fixiert und anschließend für 5 min gewässert. Dann wurden sie auf Filterpapier aufgezogen und etwa 30 min bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Die Exposition erfolgte über Nacht bei RT (Kodak XAR-5 Röntgenfilm).

2.9.5. Auswertung der Sequenzen

Die DNS-Sequenzen wurden mit Hilfe eines Computer-Programmes von Larson und Messing (1982) analysiert, sortiert und ausgedruckt.

Einige Untersuchungen wurden auch mit dem "DNA/Protein Sequence Analysis System" von International Biotechnologies Inc. auf Compaq (Portable 286) durchgeführt.

2.10. Kartierung von RNS-Fragmenten mittels S_1-Nuklease und Mung-bean-Nuklease

Hierzu wurden die eluierten, komplementären DNS-Fragmente mit Polynukleotid-Kinase endmarkiert (siehe 2.8.5.). Für die Hybridisierung mit der zu kartierenden RNS wurden jeweils 200 000-300 000 cpm der markierten DNS und etwa 30 µg Gesamtkern-RNS eingesetzt.

2.10.1. Hybridisierung in Formamid

Die Hybridisierung erfolgte für 16-20 h in einem Gesamtvolumen von 15 µl einer Lösung aus 80% Formamid und 20% 5xHybridisierungs-Puffer (Casey u. Davidson, 1977). Dazu wurde die entsprechende Menge DNS in 3 µl Hybridisierungs-Mix gelöst, mit Paraffin überschichtet, 10 min aufgekocht und sofort in einen Trockeninkubator mit Hybridisierungs-Temperatur überführt. Nach Zugabe der in 12 µl Hybridisierungs-Mix gelösten RNS wurde für die angegebene Zeit bei Hybridisierungs-Temperatur weiterinkubiert. Die Hybridisierungs-Temperatur richtete sich nach dem GC-Gehalt der zu kartierenden Fragmente und wurde entsprechend den Angaben von Maniatis et al. (1982) bestimmt.

2.10.2. Hybridisierung in Na-TCA

Die Hybridisierung erfolgte ebenfalls für 16-20 h in 10 µl Gesamtvolumen einer Lösung aus 3 M Na-TCA, 50 mM PIPES, pH 7 und 5 mM EDTA (Murray, 1986). In diesem Fall wurde die entsprechende Menge DNS in 3 µl Hybridisierungs-Mix gelöst und nach dem Überschichten mit Paraffin 5 min auf 60°C

erhitzt. Nach Überführen in einen Trockeninkubator mit 45°C (Murray, 1986) wurde wiederum die in 7 µl Hybridisierungs-Mix gelöste RNS, zugegeben und der Ansatz weiter inkubiert.

2.10.3. Kartierung der RNS-Enden mit S_1-Nuklease bzw. Mung-bean-Nuklease

Nach Beendigung der Hybridisierung wurden jeweils 190 µl eiskaltes S_1-Mix (1000 u/ml; Favaloro et al., 1980) bzw. 150 µl eiskalte Mung-bean-Nuklease-Lösung (2000 u/ml; Murray, 1986) zugegeben und der Ansatz 1-2 h bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde jeweils durch Zugabe von 75 µl (S_1-Nuklease) bzw. 60 µl (Mung-bean-Nuklease) Terminations-Puffer gestoppt und die Proben mit Phenol:Chloroform und Chloroform:Isoamylalkohol ausgeschüttelt. Dann wurden die Ansätze mit zwei Volumen Ethanol gefällt.

Nach dem Abzentrifugieren der Nukleinsäuren wurde das Pellet in 4 µl Formamid-Mix suspendiert und die Proben elektrophoretisch analysiert. Dazu wurden die unter 2.9.4. beschriebenen Sequenziergele verwendet und auch die Elektrophorese wie dort angegeben durchgeführt.

2.11. Puffer und Lösungen

DNS- und RNS-Isolierung:

Kernisolierungsmedium

400 mM Saccharose
50 mM Tris-HCl, pH 7,8
10 mM $MgCl_2$
10 mM NaCl

Proteinase K-Lösung

10 mM Tris-HCl, pH 8
10 mM EDTA
1 mM NaCl
0,5% SDS
100 µg/ml Proteinase K

Natriumborat-Puffer

25 mM $Na_2B_4O_7$, pH 9,2

Tris-$MgCl_2$-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 7,6
5 mM $MgCl_2$

Phenol

Kristallines Phenol wurde entsprechend der Methode von Maniatis et al. (1982) gelöst und behandelt und als 10-20 ml-Aliquots unter TE-Puffer und Stickstoff bei -20°C gelagert.

Phenol-Chloroform

1 Teil Phenol

1 Teil Chloroform

Chloroform:Isoamylalkohol

24 Teile Chloroform

1 Teil Isoamylalkohol

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,5 bzw. 8

1 mM EDTA

Saccharoselösungen für Dichtegradientenzentrifugation

0,5 M Saccharose in Tris-$MgCl_2$-Puffer

1,7 M Saccharose in Tris-$MgCl_2$-Puffer

Nukleasepuffer

250 mM Saccharose

10 mM Tris-HCl, pH 7,5

100 mM NaCl

1 mM $CaCl_2$

DNase I-Puffer

250 mM Saccharose

100 mM Tris-HCl, pH 7,5

2 mM $MgCl_2$

Charakterisierung von DNS:

Stop-Mix

25% Ficoll

1% SDS

0,025% Bromphenolblau

DNS-Elektrophorese-Puffer

36 mM Tris-HCl, pH 7,6

30 mM NaH_2PO_4

2 mM EDTA

TBE-Puffer (1x)

89 mM Tris

89 mM Borsäure

2 mM EDTA

Denaturierungsmedium für Southern-Transfer

1,5 M NaCl

0,5 M NaOH

Neutralisierungsmedium für Southern-Transfer

0,5 M Tris-HCl, pH 7,6

3 M NaCl

20xSSC

3 M NaCl

0,3 M Na-Citrat

pH 7 mit HCl einstellen

Charakterisierung von RNS:

RNS-Elektrophorese-Puffer

10 mM NaH_2PO_4

10 mM Na_2HPO_4

Na_2HPO_4 wird vorgelegt und der pH-Wert mit NaH_2PO_4 auf 7 eingestellt.

1xMOPS -Puffer

200 mM MOPS, pH 7 mit NaOH

50 mM Na-Acetat

5 mM EDTA

Ladepuffer

50% Glycerin

1 mM EDTA

0,4% Bromphenolblau

Denaturierungsmedium für Northern-Transfer

50 mM NaOH

10 mM NaCl

Neutralisierungsmedium für Northern-Transfer

0,1 M Tris-HCl, pH 7,5

Elutionstechniken:

Extraktionspuffer für Polyacrylamidgele

500 mM Na-Acetat

1 mM EDTA

Klonierungstechniken:

LB-Medium (1l)

10 g Trypton

5 g Yeast-Extrakt

10 g NaCl

Für Festmedien wurden noch 16 g Agar/l zugesetzt.

Antibiotikum-Konzentrationen

Ampicillin	50 mg/l
Tetracyclin	15 mg/l
Chloramphenicol	180 mg/l

Lösung I für Plasmidisolierung

25 mM Tris-HCl, pH 8

10 mM EDTA

50 mM Glucose

2 mg/ml Lysozym

Lösung II für Plasmidisolierung

0,2 N NaOH

1% SDS

Lösung III für Plasmidisolierung

3 M Kaliumacetat, pH 4,8 mit Eisessig eingestellt

10xLigationspuffer

660 mM Tris-HCl, pH 7,5

66 mM $MgCl_2$

2xYT-Medium (1l)

16 g Trypton

10 g Yeast-Extrakt

10 g NaCl

Für Festmedium wurden 16 g, für Weichagar 6 g Agar zugesetzt.

Markierungs- und Hybridisierungstechniken:

10xNicKtranslationspuffer

500 mM Tris-HCl, pH 7,8

50 mM $MgCl_2$

10 mM DTT

500 µg/ml BSA

10xTriphosphate für Nicktranslation

200 µM GTP, CTP und TTP für Markierungen mit ATP

200 µM GTP, ATP und TTP für Markierungen mit CTP

20xSSPE

3 M NaCl

0,02 M EDTA

0,2 M NaH_2PO_4

pH 7 mit NaOH eingestellt

100xDenhardt (Denhardt, 1966)

2% Ficoll w/v

2% Polyvinylpyrrolidon w/v

2 % BSA w/v

10xPolynukleotidkinase-Puffer

0,7 M Tris-HCl, pH 7,6

0,1 M $MgCl_2$

1 M KCl

DNS-Sequenzierung:

Primer-Lösung

15mer-Sequencing-Primer (Boehringer)

gelöst in H_2O (5 ng/µl)

10xAnnealing-Puffer

100 mM Tris-HCl, pH 8

50 mM $MgCl_2$

Basenmixe (G-Mix, A-Mix, T-Mix, C-Mix)

Die Mixe wurden nach dem "M 13 cloning and sequencing handbook" der Firma Amersham-Buchler (1983) hergestellt.

Reaktions-Mix

1 µCi dATP (400 Ci/mmol)

1 u Klenow-Polymerase

mit H_2O auf 9 µl auffüllen

Chase-Lösung

500 µM ATP

500 µM GTP

500 µM TTP

500 µM CTP

Formamid-Mix

9,6 ml frisch deionisiertes Formamid

0,4 ml 0,5 M EDTA, pH 8

30 mg Bromphenolblau

30 mg Xylencyanol

Kartierung von RNS-Fragmenten mittels S_1-Nuklease und Mung-bean-Nuklease:

5xHybridisierungs-Puffer (Formamid)

0,2 M PIPES, pH 6,4

2 M NaCl

5 mM EDTA

1xHybridisierungs-Puffer (Na-TCA)

3 M Na-TCA

50 mM PIPES, pH 7

5 mM EDTA

10xS_1-Puffer

2,8 M NaCl

0,3 M Na-Acetat, pH 4,5

45 mM $ZnSO_4$

S_1-Mix (1ml)

100 µl 10xS_1-Puffer

12,5 µg Kalbsthymus-DNS, frisch denaturiert

1000 u Nuklease S_1

mit H_2O auf 1 ml auffüllen

Mung-bean-Nuklease-Lösung

50 mM NaCl

30 mM Na-Acetat, pH 4,6

1 mM $ZnCl_2$

20 µg/ml Kalbsthymus-DNS, frisch denaturiert

2000 u/ml Mung-bean-Nuklease

Terminationspuffer

2,5 M Ammonium-Acetat

50 mM EDTA, pH 7

2.12. Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

2.12.1. Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalie der Firma Merck (Reinheitsgrad "zur Analyse", "zur Synthese" oder -für die Anzucht von Bakterien- "reinst") verwendet.

Acrylamid (2xkristallisiert)	Serva
Actinomycin D	Serva
Agar	Difco
Agarose für Gele	Pharmacia od. Seakem
Amberlite MB-1 Ionenaustauscherharz	Pharmacia
Ammoniumpersulfat	Serva
Ampicillin	Serva
BSA	Sigma
BSA für Enzymreaktionen	Boehringer
Calciumhypochlorit (pract.)	Fluka GmbH
Chloramphenicol	Serva
DNS-Präparate:	
aus Heringssperma	Serva
aus dem Bacteriophagen Lambda	BRL
aus ΦX 174 RF/Hae III-geschnitten	BRL
123 bp-Leiter	BRL
DTT	Serva
Eisessig	Hedinger GmbH
Ethidiumbromid	Serva

Ficoll 400	Pharmacia
2-Mercaptoethanol	Serva
N,N`-Methylenbisacrylamid	Serva
MOPS	Serva
Nukleotidtriphosphate	Boehringer
PIPES	Serva
Polyvinypyrrolidon	Serva
Quickszint 501	Zinsser
RNS-Präparate:	
aus E. coli (16S und 23S rRNS)	Boehringer
aus E. coli (t-RNS)	Boehringer
aus Hefe (t-RNS)	Boehringer
Röntgenfilmentwickler	Kodak
Röntgenfilmfixierer	Kodak
SDS	Serva
Sephadex-G 50 fine	Pharmacia
Sequencing Primer (15mer)	Boehringer
Spermidin	Serva
TEMED	Serva
Tetracyclin	Serva
Triton X-100	Serva
Trypton	Difco
Xylencyanol	Serva
Yeast Extract	Difco

2.12.2. Radioaktiv markierte Substanzen

Alle radioaktiv markierten Substanzen wurden von der Firma Amersham-Buchler bezogen.

α-^{32}P-dCTP	3000 Ci/mmol
α-^{32}P-dATP	3000 Ci/mmol
α-^{32}P-dATP	400 Ci/mmol
γ-^{32}P-ATP	3000 Ci/mmol

2.12.3. Enzyme

Restriktionsenzyme wurden, sofern nicht anders angegeben, von der Firma Boehringer bezogen.

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	Boehringer
DNase I	Serva od. Boehringer
DNA-Ligase aus T4	Renner
DNA-Polymerase I	Boehringer
DNA-Polymerase I "large fragment" (Klenow-Polymerase)	Boehringer
Lysozym	Merck
Micrococcus-Nuklease	Boehringer
Mung-bean-Nuklease	Boehringer
Proteinase K	Merck
RNase	Boehringer
S_1-Nuklease	Boehringer
T4-Polynukleotidkinase	BRL

2.12.4. Verbrauchsmaterialien

Membranfilter BA Ø 47 mm, 24 mm Porengröße 0,45 µm	Schleicher&Schüll
Nitrocellulose HAHY, Porengröße 0,45 µm	Millipore
Röntgenfilme X-omat S und XAR	Kodak
Dialyseschläuche	Serva od. Kästner
Chromatographiepapiere	Whatman od. Schleicher&Schüll

2.13. Abkürzungen

Sofern nicht anders angegeben, werden die gebräuchlichen Abkürzungen verwendet.

bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cpm	Zerfallsimpulse/min
D	Dalton
DTT	Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N`-tetraessigsäure
kbp	1000 Basenpaare
MOI	"mulitiplicity of infection"
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NTA	Nitrilotetraessigsäure
OD	Optische Dichte
PEG	Polyethylenglykol
PIPES	Piperazin-N,N`-bis (2-hydroxypropan-sulfonsäure
RF	Replikative Form
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	Einzelstrang-Form
TCA	Trichloracetat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
u	Enzymeinheit

Upm	Umdrehungen/min
Vol.	Volumen
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

3. Ergebnisse

3.1. Feinkartierung des 5'externen Spacers der Mung-Bohne

In der Diplomarbeit wurden bereits drei genomische heterogene rDNS-Repetitionseinheiten identifiziert. Die einzelnen Repetitionseinheiten sind von Hind III-Schnittstellen flankiert und lassen sich daher mit diesem Restriktionsenzym herausschneiden. Ihre Größe beträgt 10,2 kbp, 10,5 kbp und 11 kbp, wobei die Repeatklasse mittlerer Größe am häufigsten vertreten ist. Neben diesen Hauptvertretern der rDNS der Mung-Bohne existieren aber noch weitere, weniger häufig vertretene Repetitionseinheiten. Die rDNS wurde mittels verschiedener Restriktionsenzyme kartiert und die Lage der rRNS-Gene durch eine Hybridisierung mit ^{32}P-endmarkierter 18S und 25S rRNS festgelegt (Gerstner, 1983).

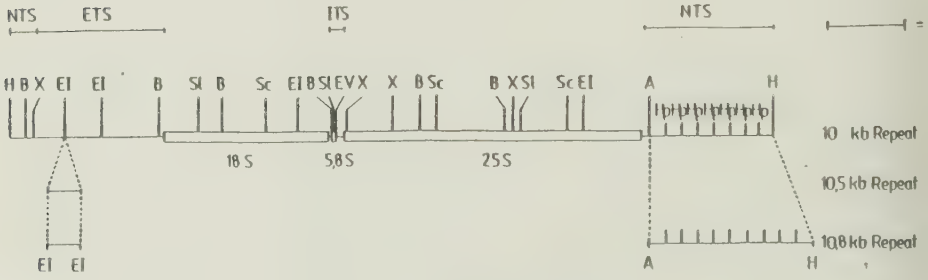


Abb. 5: Restriktionskarte der klonierten rDNS-Repetitionseinheiten der Mung-Bohne (pRV 1 - 3).

In einer weiteren Diplomarbeit (Schiebel, 1984) wurden drei heterogene rDNS-Repetitionseinheiten der Größe 10 kbp, 10,5 kbp und 10,8 kbp (pRV 1, 2 und 3) im Phagen kloniert, und die Restriktionskartierung verfeinert. Eine zusammenfassende Restriktionskarte der klonierten Repetitionseinheiten zeigt Abb. 5.

Als weitere Vorarbeit wurden von K. Schiebel Bam HI-Subklone der klonierten rDNS-Repetitionseinheiten in pBR 322 hergestellt. Die in Material und Methoden (Abb. 4) beschriebenen Klone pRV 4 (1,65 kbp) und pRV 5 (2,1 kbp) beinhalten jeweils den größten Teil des 5`externen Spacers zweier heterogener rDNS-Repetitionseinheiten. Die Klone der Größe 10,5 kbp und 10,8 kbp besitzen den größeren 2,1 kbp-Spacer, der 10 kbp-Repeat den kleinen 1,65 kbp-Spacer. Ein Verdau genomischer DNS mit Bam HI und eine anschließende Hybridisierung der erhaltenen Fragmente mit dem ^{32}P-nicktranslatierten Insert aus pRV 4 oder pRV 5 zeigt aber, daß auch noch Repetitionseinheiten mit größeren 5`externen Spacerbereichen existieren, deren Größe 2,5 kbp, 2,9 kbp und sogar noch 3,3 kbp beträgt (Abb. 6).

Durch einen teilweise unvollständigen Doppelverdau dieser Plasmide mit den Restriktionsendonukleasen Bam HI und Eco RI kann nun gezeigt werden, daß die Heterogenität dieses Spacerbereichs auf dem ein- (pRV 4) bzw. zweifachen (pRV 5) Vorkommen eines 450 bp-Eco RI-Fragmentes beruht. Abb. 7 zeigt deutlich, daß die Bande, die dieses Fragment repräsentiert, in pRV 5 wesentlich stärker ist als in pRV 4. Diese beiden

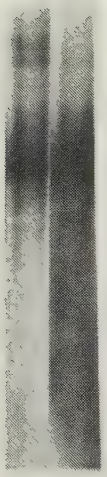


Abb. 6: Nachweis heterogener 5'externer Spacerregionen in der genomischen rDNS der Mung-Bohne.
Genomische DNS aus Hypokotyl und Primärblättern von Vigna radiata wurde mit Bam HI verdaut, auf 1%igen Agarosegelen aufgetrennt und nach dem Transfer auf Nitrocellulose mit dem ^{32}P-nicktranslatierten 450 bp Eco RI-Fragment aus Klon pRV 4 hybridisiert.
1: DNS aus Hypokotyl
2: DNS aus Primärblättern

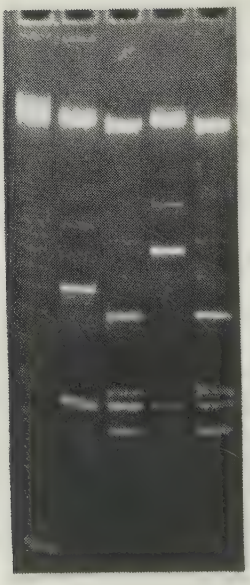


Abb. 7: Lokalisierung der Heterogenität im 5'externen Spacerbereich.
DNS der Plasmide pRV 4 und pRV 5 wurde einem unvollständigen Doppelverdau mit Bam HI und Eco RI (2,4) bzw. einem unvollständigen Verdau mit Eco RI (1,3) unterzogen, auf 2,5%igen Agarosegelen aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.
1: pRV 5, Eco RI-verdaut
2: pRV 5, Bam HI/Eco RI-verdaut
3: pRV 4, Eco RI-verdaut
4: pRV 4, Bam HI/Eco RI-verdaut
M: 123 bp-Leiter als Marker

450 bp-Eco RI-Fragmente liegen im größeren Spacer-Klon nebeneinander, was aus dem Auftreten einer 900 bp-Bande geschlossen werden konnte, die bei unvollständigem Verdau von pRV 5 mit den Restriktionsenzymen Bam HI und Eco RI auftritt. Bei den oben erwähnten, in Abb. 6 dargestellten größeren genomischen rDNS-Repetitionseinheiten divergiert die Größe des 5`externen Spacers um jeweils etwa 450 bp. Mit großer Wahrscheinlichkeit beruhen diese Größendifferenzen auf dem Auftreten von drei, vier oder sogar fünf 450 bp-Eco RI-Fragmenten im heterogenen 5`externen Spacer.

Das (die) 450 bp-Eco RI-Fragment(e) werden 5`wärts flankiert von einem 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment und 3`wärts von einem 730 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment. Dieser Aufbau der Spacer-Region konnte aus Einzelabbauten der Plasmide pRV 4 und pRV 5 mit Eco RI abgeleitet werden, bei denen die flankierende 480 bp- und 730 bp-Bam HI/Eco RI-Fragmente jeweils noch mit den entsprechenden Plasmidfragmenten zusammenhängen. In diesem Fall werden nur die 450 bp-Eco RI-Fragmente herausgeschnitten. Wie Abb. 4 zeigt, hängt in pRV 4 das 730 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment am 375 bp Bam HI/Eco RI-Plasmidfragment und ergibt ein 1100 bp Eco RI-Fragment, während das 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment am 4 kbp-Restplasmid hängt. Im Klon pRV 5 ist das Spacer-Fragment umgekehrt inseriert, d.h. hier hängt das kleinere 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment am 375 bp-Bam HI/Eco RI-Plasmidfragment (dies ergibt ein 860 bp-Eco RI-Fragment) und das größere 730 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment am 4 kbp-

Restplasmid. Bei den oben erwähnten, in Abb. 6 gezeigten größeren genomischen rDNS-Repetitionseinheiten divergiert die Größe des 5`externen Spacers um jeweils etwa 450 bp. Mit großer Wahrscheinlichkeit beruhen diese Größendifferenzen auf dem Auftreten von drei, vier oder sogar fünf 450 bp-Eco RI Fragmenten im heterogenen 5`externen Spacer.

Um festzustellen, ob die beiden 450 bp-Eco RI-Fragmente im größeren Spacer Unterschiede aufweisen, wurde der Klon pRV 5 unvollständig mit den Restriktionsenzymen Bam HI und Eco RI abgebaut und die erhaltenen Fragmente in ein ebenfalls Bam HI/Eco RI-geschnittenes pBR 322 ligiert. Dabei sollten einerseits Klone entstehen, die ein 480 bp-Bam HI/Eco RI- und dessen benachbartes 450 bp-Eco RI-Fragment enthalten und andrerseits Klone, die ein 730 bp-Bam HI/Eco RI- und wiederum das benachbarte 450 bp-Eco RI-Fragment enthalten. Durch Miniscreen wurden die gewünschten Klone identifiziert und die 450 bp-Eco RI-Fragmente aus je einem repräsentativen Klon eluiert. Abbauten mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen, die 4 bp-Sequenzen erkennen, zeigten keinen Unterschied zwischen den beiden 450 bp-Eco RI-Fragmenten.

Um zu klären, ob die beiden 450 bp-Eco RI-Fragmente in gleicher oder in umgekehrter Orientierung im Spacer vorliegen, wurden die drei Eco RI- bzw. Bam HI/Eco RI-Fragmente dieser Region (450 bp, 480 bp und 730 bp) jeweils mit der Restriktionsendonuklease Hpa II kartiert; ebenso wurden die gesamten Bam HI-Inserts der Klone pRV 4 und pRV 5

mit Hpa II abbgebaut (Abb. 8). Dabei zeigte sich, daß das 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment keine Hpa II-Schnittstelle besitzt. Das 450 bp-Eco RI-Fragment wird in drei Hpa II-Subfragmente der Größe 60 bp, 135 bp und 255 bp zerschnitten. Das 730 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment besitzt ebenfalls ein 60 bp- und ein 135 bp-Hpa II-Subfragment, zusätzlich noch ein 485 bp-Hpa II-Subfragment. Zwei kleine 15 bp- und 25 bp-Hpa II-Subfragmente am 3`Ende des 730 bp-Fragmentes konnten erst aus DNS-Sequenzierungs-Daten identifiziert werden. Beim Verdau der gesamten heterogenen Bam HI-Inserts aus pRV 4 und pRV 5 mit Hpa II konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Klonen gefunden werden. Man erhält ein 540 bp-Bam HI/Hpa II-Subfragment, das sich aus dem nicht geschnittenen 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment und dem kleinsten 60 bp-Eco RI/Hpa II-Fragment zusammensetzt; außerdem werden die 485 bp- und 135 bp-Hpa II-Subfragmente herausgeschnitten. Die 255 bp-Eco RI/Hpa II-Subfragmente aus den 450 bp-Eo RI-Fragmenten und die 60 bp-Eco RI/Hpa II-Subfragmente aus den 450 bp-Eco RI- und den 730-bp Bam HI/Eco RI-Fragmenten hängen bei diesem Verdau zusammen und ergeben ein 320 bp-Hpa II-Subfragment. Da keine weiteren Hpa II-Subfragmente im größeren Klon pRV 5 auftraten, die auf eine umgekehrte Orientierung der 450 bp-Eco RI-Fragmente hätten schließen lassen, kann festgestellt werden, daß die 450 bp-Eco RI-Fragmente als direkt repetierte Elemente vorliegen. Abb. 9 faßt die so gewonnene Feinkarte der Spacer-Region zusammen.

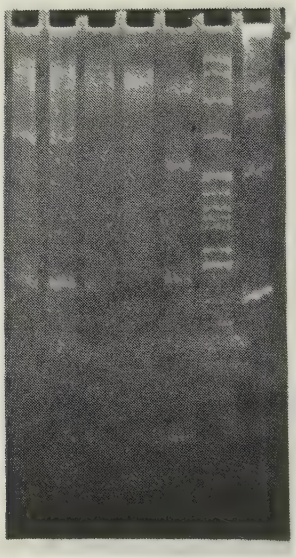


Abb. 8: Feinkartierung des 5'externen Spacerbereichs der Mung-Bohne.
Die eluierten Inserts der Klone pRV 4 und pRV 5 sowie die Subfragmente aus diesen Inserts, das 480 bp-Bam HI/Eco RI-, das 450 bp-Eco RI- und das 730 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment (vgl. Abb. 4) aus der 5'externen Spacerregion der Mung-Bohne wurden mit Hpa II verdaut, die erhaltenen Fragmente auf einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.
1: Insert aus pRV 4
2: Insert aus pRV 5
3: 730 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment
4: 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment
5: 450 bp-Eco RI-Fragment
} Hpa II verdaut
M_1: pBR 322, Hpa II verdaut
M_2: 123 bp-Leiter
} als Marker

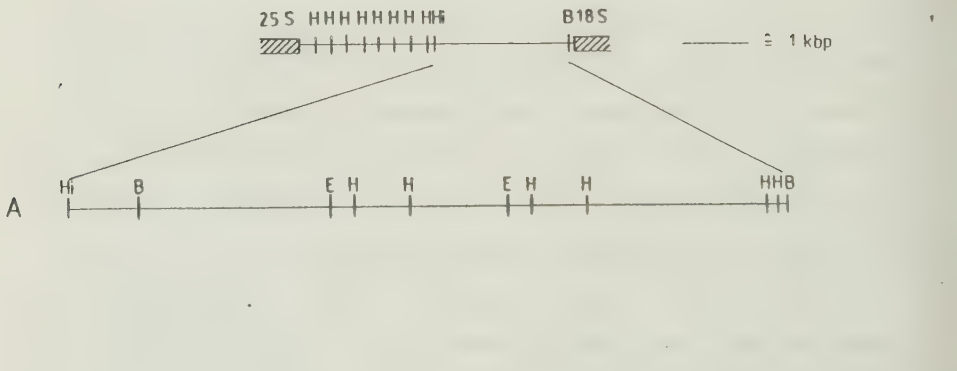


Abb. 9: Detail-Restriktionskarte der heterogenen 5'externen Spacerregion der Mung-Bohne.
A: 5'externer Spacerbereich mit einem 450 bp-Eco RI-Fragment
B: 5'externer Spacerbereich mit zwei 450 bp-Eco RI-Fragmenten
B = Bam HI H = Hpa II
E = Eco RI Hi = Hind III

3.2. DNS-Sequenzierung des 5`externen Spacers

Um die DNS-Sequenz des 5`externen Spacers zu bestimmen, wurden die bereits beschriebenen Bam HI/Eco RI- bzw. Eco RI-Fragmente aus pRV 4 und pRV 5 sowie das 485 bp-Hpa II-Subfragment aus dem 730 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment ebenfalls beider Spacer-Klone in die M13-Phagen mp 8 oder mp 18 bzw. mp 9 oder mp 19 umkloniert. Es wurden fünf Klone mit dem 450 bp-Eco RI-Fragment aus pRV 5 sequenziert. Auch ein 5`wärts des 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragmentes gelegenes 185 bp-Bam HI/Hind III-Fragment aus Klon pRV 6 wurde in M13-Phagen umkloniert. Eine Übersicht über die Sequenzierungs-Strategie zeigt Abb. 10.

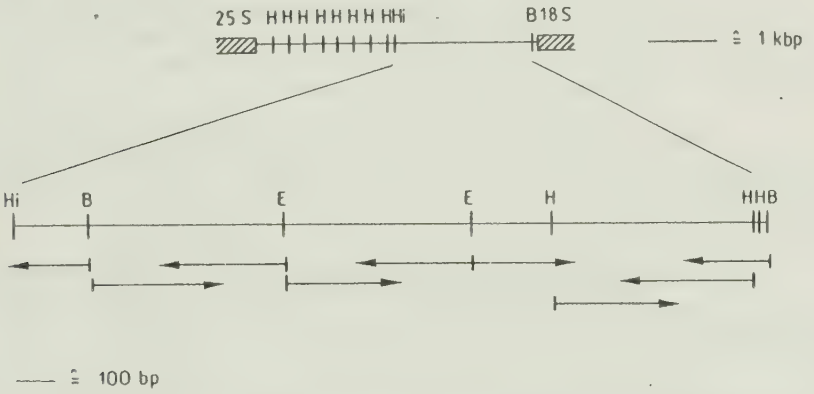
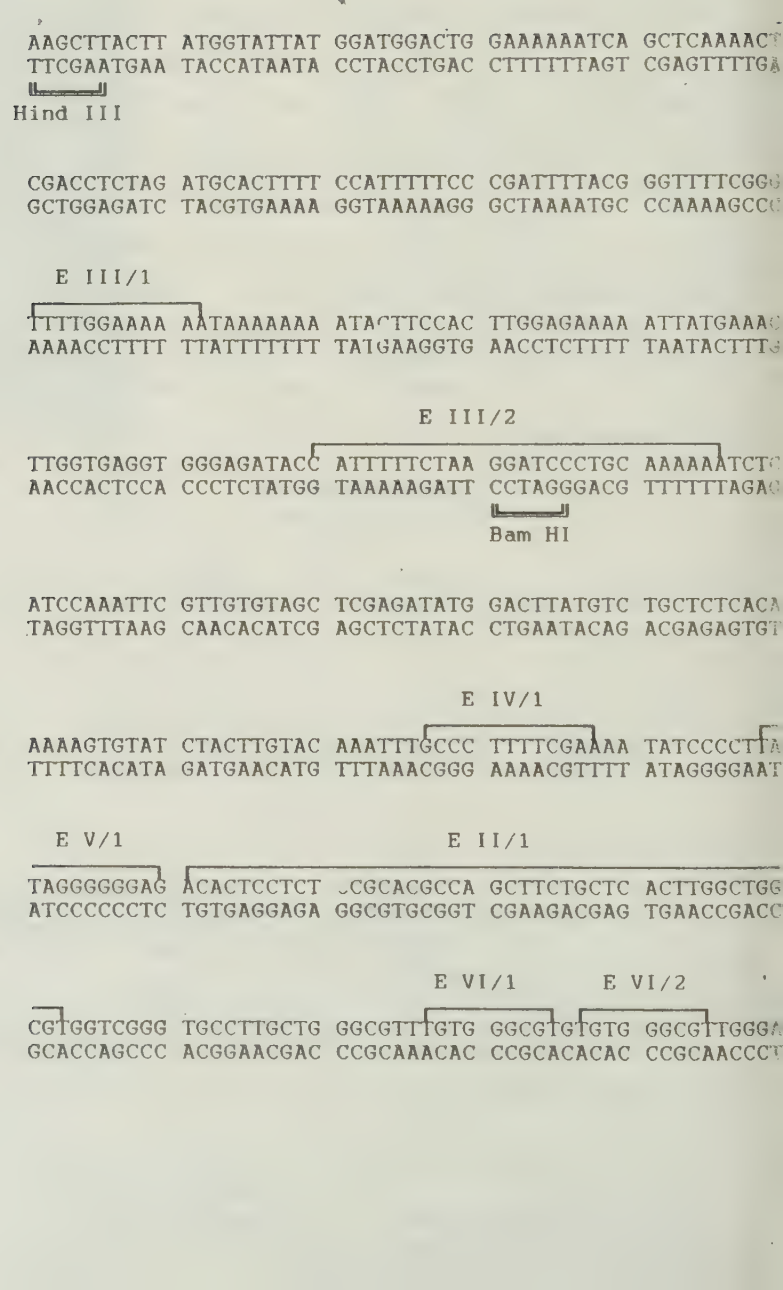
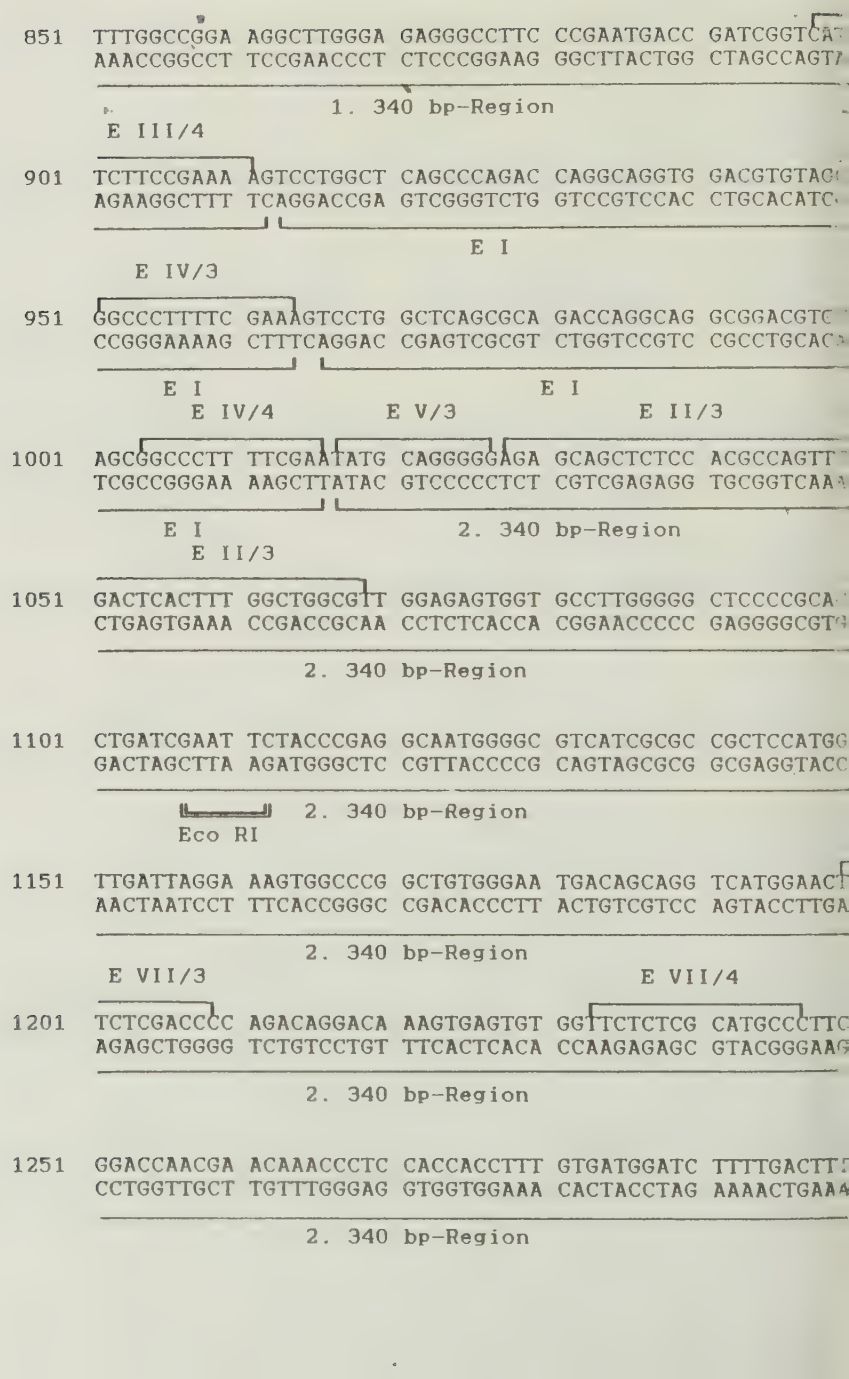


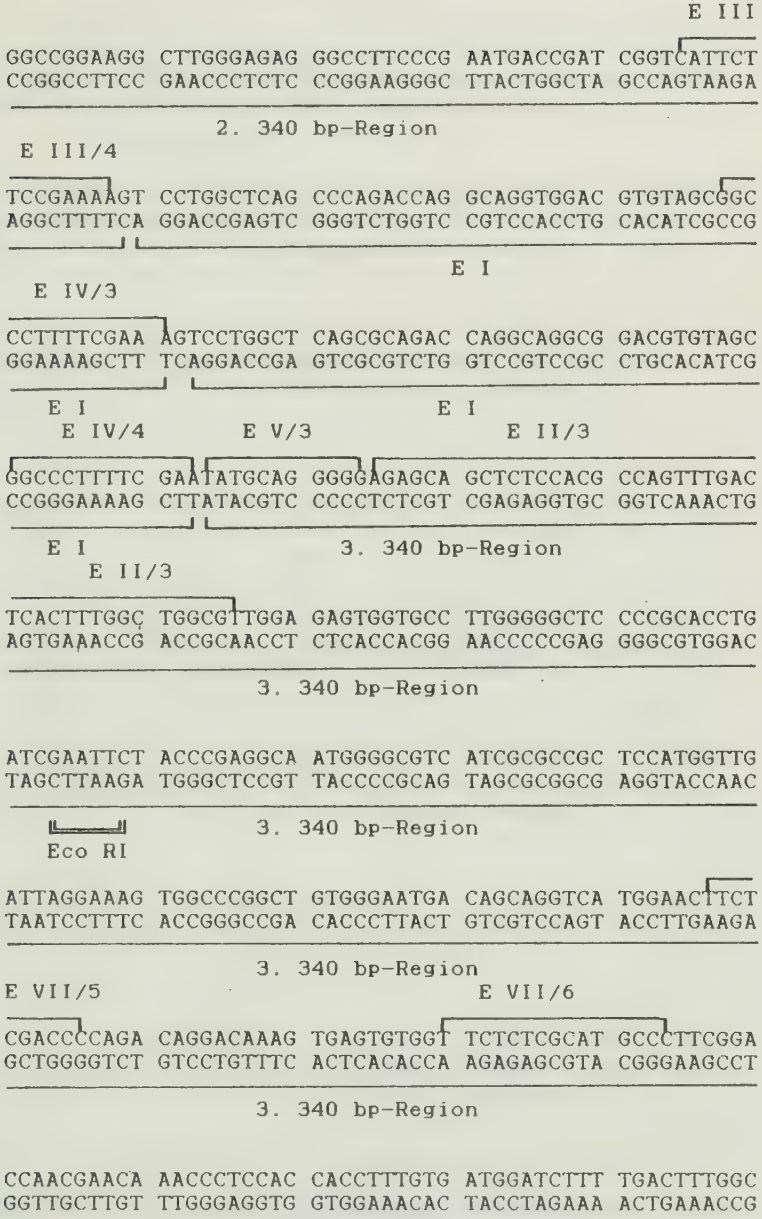
Abb. 10: Übersicht über die Strategie der DNS-Sequenzierung der 5'externen Spacerregion aus pRV 4 der Mung-Bohne. Die Fragmente aus pRV 5 wurden in gleicher Weise sequenziert.

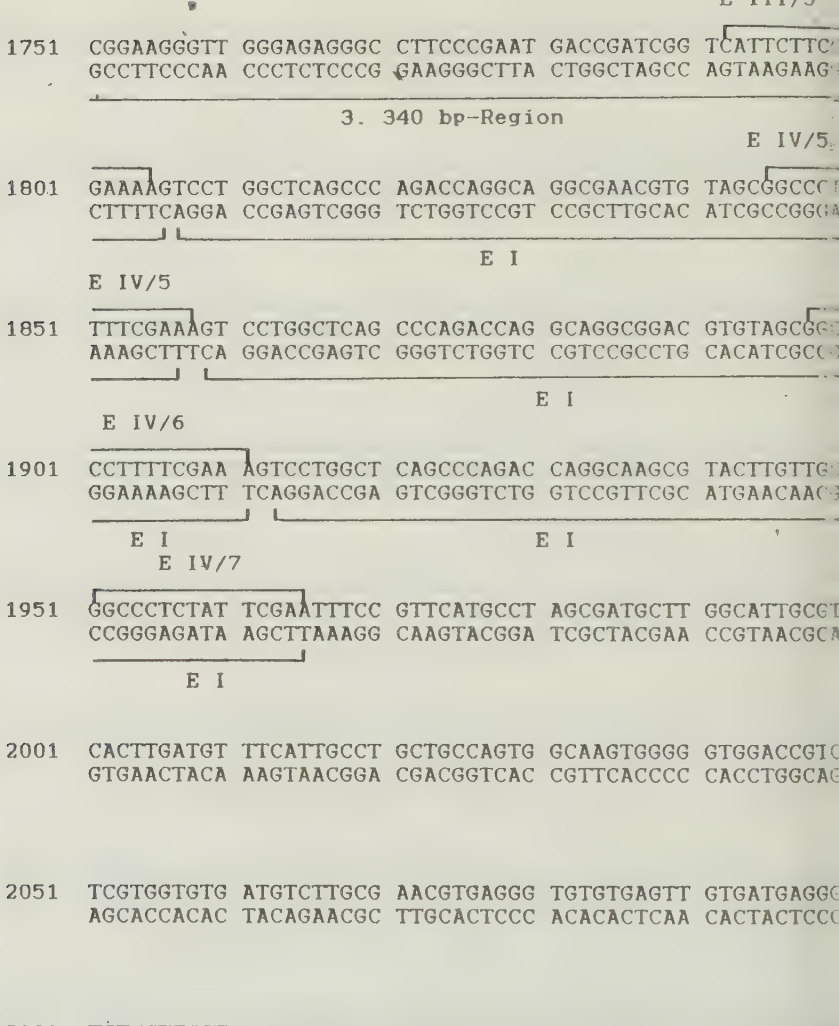
Die dadurch aufgeklärte Sequenz des 5`externen rDNS-Spacers von Vigna radiata zeigt Abb. 11.


1 AAGCTTACTT ATGGTATTAT GGATGGACTG GAAAAAATCA GCTCAAAAC
TTCGAATGAA TACCATAATA CCTACCTGAC CTTTTTTAGT CGAGTTTTG
Hind III
51 CGACCTCTAG ATGCACTTTT CCATTTTTCC CGATTTTACG GGTTTTCGG
GCTGGAGATC TACGTGAAAA GGTAAAAAGG GCTAAAATGC CCAAAAGCC
E III/1
101 TTTTGGAAAA AATAAAAAAA ATACTTCCAC TTGGAGAAAA ATTATGAAA
AAAACCTTTT TTATTTTTTT TATGAAGGTG AACCTCTTTT TAATACTTT
E III/2
151 TTGGTGAGGT GGGAGATACC ATTTTTCTAA GGATCCCTGC AAAAAATCT
AACCACTCCA CCCTCTATGG TAAAAAGATT CCTAGGGACG TTTTTTAGA
Bam HI
201 ATCCAAATTC GTTGTGTAGC TCGAGATATG GACTTATGTC TGCTCTCAC
TAGGTTTAAG CAACACATCG AGCTCTATAC CTGAATACAG ACGAGAGTG
E IV/1
251 AAAAGTGTAT CTACTTGTAC AAATTTGCCC TTTTCGAAAA TATCCCCTT
TTTTCACATA GATGAACATG TTTAAACGGG AAAACGTTTT ATAGGGGAA
E V/1
E II/1
301 TAGGGGGGAG ACACTCCTCT CGCACGCCA GCTTCTGCTC ACTTGGCTG
ATCCCCCCTC TGTGAGGAGA GGCGTGCGGT CGAAGACGAG TGAACCGAC
E VI/1
E VI/2
351 CGTGGTCGGG TGCCTTGCTG GGCGTTTGTG GGCGTGTGTG GGCGTTGGG
GCACCAGCCC ACGGAACGAC CCGCAAACAC CCGCACACAC CCGCAACCC

```
401  TTCCGAATGT TGGCCTGCAA ACCCAGGCAA TGTGGCACGG TCGTGGGAAA
     AAGGCTTACA TCCGGACGTT TGGGTCCGTT ACACCGTGCC AGCACCCTTT

          E VII/1                                  E VII/2
451  TTCTCGACCC GAGACAGGTT AAAGTGAGCG TGGTTCTCGA CCCTTCCCAG
     AAGAGCTGGG CTCTGTCCAA TTTCACTCGC ACCAAGAGCT GGGAAGGGTC

        E III/3
501  TCATTTTTCC GAAAAGTCCT GGCTCAGCCC TGACCAGGCA GGCGATCATG
     AGTAAAAAGG CTTTTCAGGA CCGAGTCGGG ACTGGTCCGT CCGCTAGTAC

                                          E I
          E IV/2              E V/2                E II/2
551  TAGCGGCCCT TTTCGAATAT ATATGGGGGG GGAGCAGCTC TCCACGCCAG
     ATCGCCGGGA AAAGCTTATA TATACCCCCC CCTCGTCGAG AGGTGCGGTC

          E I                          1. 340 bp-Region
             E II/2
601  TTTGACTCAC TTTGGCTGGC GTTGGAGAGT GGTGCCTTGG GGGCTCCCCG
     AAACTGAGTG AAACCGACCG CAACCTCTCA CCACGGAACC CCCGAGGGGC

                          1. 340 bp-Region

651  CACCTGATCG AATTCTACCC GAGGCAATGG GGCGTCATCG CGCCGCTCCA
     GTGGACTAGC TTAAGATGGG CTCCGTTACC CCGCAGTAGC GCGGCGAGGT

                1. 340 bp-Region
             Eco RI

701  TGGTTGATTA GGAAAGTGGC CCGGCTGTGG GAATGACAGC AGGTCATGGA
     ACCAACTAAT CCTTTCACCG GGCCGACACC CTTACTGTCG TCCAGTACCT

                          1. 340 bp-Region
          E VII/3                                  E VII/4
751  ACTTCTCGAC CCCAGACAGG ACAAAGTGAG TGTGGTTCTC TCGCATGCCC
     TGAAGAGCTG GGGTCTGTCC TGTTTCACTC ACACCAAGAG AGCGTACGGG

                          1. 340 bp-Region

801  TTCGGACCAA CGAACAAACC CTCCACCACC TTTGTGATGG ATCTTTTGAC
     AAGCCTGGTT GCTTGTTTGG GAGGTGGTGG AAACACTACC TAGAAAACTG

                          1. 340 bp-Region
```


851 TTTGGCCGGA AGGCTTGGGA GAGGGCCTTC CCGAATGACC GATCGGTCA
AAACCGGCCT TCCGAACCCT CTCCCGGAAG GGCTTACTGG CTAGCCAGT
1. 340 bp-Region
E III/4
901 TCTTCCGAAA AGTCCTGGCT CAGCCCAGAC CAGGCAGGTG GACGTGTAG
AGAAGGCTTT TCAGGACCGA GTCGGGTCTG GTCCGTCCAC CTGCACATC
E I
E IV/3
951 GGCCCTTTTC GAAAGTCCTG GCTCAGCGCA GACCAGGCAG GCGGACGTC
CCGGGAAAAG CTTTCAGGAC CGAGTCGCGT CTGGTCCGTC CGCCTGCAC
E I
E I
E IV/4
E V/3
E II/3
1001 AGCGGCCCTT TTCGAATATG CAGGGGGAGA GCAGCTCTCC ACGCCAGTT
TCGCCGGGAA AAGCTTATAC GTCCCCCTCT CGTCGAGAGG TGCGGTCAA
E I
2. 340 bp-Region
E II/3
1051 GACTCACTTT GGCTGGCGTT GGAGAGTGGT GCCTTGGGGG CTCCCCGCA
CTGAGTGAAA CCGACCGCAA CCTCTCACCA CGGAACCCCC GAGGGGCGT
2. 340 bp-Region
1101 CTGATCGAAT TCTACCCGAG GCAATGGGGC GTCATCGCGC CGCTCCATGG
GACTAGCTTA AGATGGGCTC CGTTACCCCG CAGTAGCGCG GCGAGGTACC
2. 340 bp-Region
Eco RI
1151 TTGATTAGGA AAGTGGCCCG GCTGTGGGAA TGACAGCAGG TCATGGAAC
AACTAATCCT TTCACCGGGC CGACACCCTT ACTGTCGTCC AGTACCTTGA
2. 340 bp-Region
E VII/3
E VII/4
1201 TCTCGACCCC AGACAGGACA AAGTGAGTGT GGTTCTCTCG CATGCCCTTC
AGAGCTGGGG TCTGTCCTGT TTCACTCACA CCAAGAGAGC GTACGGGAAG
2. 340 bp-Region
1251 GGACCAACGA ACAAACCCTC CACCACCTTT GTGATGGATC TTTTGACTT
CCTGGTTGCT TGTTTGGGAG GTGGTGGAAA CACTACCTAG AAAACTGAA
2. 340 bp-Region


E III
1301 GGCCGGAAGG CTTGGGAGAG GGCCTTCCCG AATGACCGAT CGGTCATTCT
CCGGCCTTCC GAACCCTCTC CCGGAAGGGC TTACTGGCTA GCCAGTAAGA
2. 340 bp-Region
E III/4
1351 TCCGAAAAGT CCTGGCTCAG CCCAGACCAG GCAGGTGGAC GTGTAGCGGC
AGGCTTTTCA GGACCGAGTC GGGTCTGGTC CGTCCACCTG CACATCGCCG
E I
E IV/3
1401 CCTTTTCGAA AGTCCTGGCT CAGCGCAGAC CAGGCAGGCG GACGTGTAGC
GGAAAAGCTT TCAGGACCGA GTCGCGTCTG GTCCGTCCGC CTGCACATCG
E I
E I
E IV/4
E V/3
E II/3
1451 GGCCCTTTTC GAATATGCAG GGGGAGAGCA GCTCTCCACG CCAGTTTGAC
CCGGGAAAAG CTTATACGTC CCCCTCTCGT CGAGAGGTGC GGTCAAACTG
E I
3. 340 bp-Region
E II/3
1501 TCACTTTGGC TGGCGTTGGA GAGTGGTGCC TTGGGGGCTC CCCGCACCTG
AGTGAAACCG ACCGCAACCT CTCACCACGG AACCCCCGAG GGGCGTGGAC
3. 340 bp-Region
1551 ATCGAATTCT ACCCGAGGCA ATGGGGCGTC ATCGCGCCGC TCCATGGTTG
TAGCTTAAGA TGGGCTCCGT TACCCCGCAG TAGCGCGGCG AGGTACCAAC
3. 340 bp-Region
Eco RI
1601 ATTAGGAAAG TGGCCCGGCT GTGGGAATGA CAGCAGGTCA TGGAACTTCT
TAATCCTTTC ACCGGGCCGA CACCCTTACT GTCGTCCAGT ACCTTGAAGA
3. 340 bp-Region
E VII/5
E VII/6
1651 CGACCCCAGA CAGGACAAAG TGAGTGTGGT TCTCTCGCAT GCCCTTCGGA
GCTGGGGTCT GTCCTGTTTC ACTCACACCA AGAGAGCGTA CGGGAAGCCT
3. 340 bp-Region
1701 CCAACGAACA AACCCTCCAC CACCTTTGTG ATGGATCTTT TGACTTTGGC
GGTTGCTTGT TTGGGAGGTG GTGGAAACAC TACCTAGAAA ACTGAAACCG
3. 340 bp-Region


E III/5
1751 CGGAAGGGTT GGGAGAGGGC CTTCCCGAAT GACCGATCGG TCATTCTTC
GCCTTCCCAA CCCTCTCCCG GAAGGGCTTA CTGGCTAGCC AGTAAGAAG
3. 340 bp-Region
E IV/5
1801 GAAAAGTCCT GGCTCAGCCC AGACCAGGCA GGCGAACGTG TAGCGGCCC
CTTTTCAGGA CCGAGTCGGG TCTGGTCCGT CCGCTTGCAC ATCGCCGGC
E I
E IV/5
1851 TTTCGAAAGT CCTGGCTCAG CCCAGACCAG GCAGGCGGAC GTGTAGCGG
AAAGCTTTCA GGACCGAGTC GGGTCTGGTC CGTCCGCCTG CACATCGCC
E I
E IV/6
1901 CCTTTTCGAA AGTCCTGGCT CAGCCCAGAC CAGGCAAGCG TACTTGTTG
GGAAAAGCTT TCAGGACCGA GTCGGGTCTG GTCCGTTCGC ATGAACAAC
E I
E I
E IV/7
1951 GGCCCTCTAT TCGAATTTCC GTTCATGCCT AGCGATGCTT GGCATTGCG
CCGGGAGATA AGCTTAAAGG CAAGTACGGA TCGCTACGAA CCGTAACGC
E I
2001 CACTTGATGT TTCATTGCCT GCTGCCAGTG GCAAGTGGGG GTGGACCGT
GTGAACTACA AAGTAACGGA CGACGGTCAC CGTTCACCCC CACCTGGCA
2051 TCGTGGTGTG ATGTCTTGCG AACGTGAGGG TGTGTGAGTT GTGATGAGG
AGCACCACAC TACAGAACGC TTGCACTCCC ACACACTCAA CACTACTCC
2101 TGTCCTTGTT GGCTGGCTCC ATGCCTTGTG CATCGAACGG TCGAACATG
ACAGGAACAA CCGACCGAGG TACGGAACAC GTAGCTTGCC AGCTTGTAC
2151 ATCCTGTTCG TTTTGCTCCC GTAGCCTTGG GTGATGATGC CCGTTCAGT
TAGGACAAGC AAAACGAGGG CAACGGAACC CACTACTACG GGCAAGTCA

```
2151  ATCCTGTTCG TTTTGCTCCC GTTGCCTTGG GTGATGATGC CCGTTCAGTC
      TAGGACAAGC AAAACGAGGG CAACGGAACC CACTACTACG GGCAAGTCAG

2201  CCTGTGTTGC CTACCTTCTA AACGGTATAC GTGTGGCCGG TTTTAGAATT
      GGACACAACG GATGGAAGAT TTGCCATATG CACACCGGCC AAAATCTTAA

2251  GTATCCATCC AGGCCTTCTC CGGTAGGTGT TGGAGGATCC
      CATAGGTAGG TCCGGAAGAG GCCATCCACA ACCTCCTAGG
                                          Bam HI
```

Abb. 11: DNS-Sequenz der 5'externen Spacerregion der Mung-Bohne.
Der sequenzierte Bereich beginnt an der Hind III-Schnittstelle im Spacer.
Dargestellt ist der 5'externe Spacerbereich mit zwei 450 bp-Eco RI- Fragmenten.
Die Nummerierung der Elemente bezieht sich auf die Spacerregion mit einem 450 bp-Eco RI-Fragment. Die Elemente im zweiten 450 bp-Eco RI-Fragment der großen Spacerregion tragen die gleichen Nummern wie die im ersten.
E = Element

Auch die Sequenzanalyse von fünf Klonen mit 450 bp-Eco RI-Fragmenten aus pRV 5 zeigte keine Basenaustausche zwischen diesen Fragmenten, die im größeren heterogenen Spacer nebeneinanderliegen. Zumindest die sequenzierten Fragmente weisen eine vollständig identische DNS-Sequenz auf.

Durch Computeranalyse der DNS-Sequenz konnten im großen 5`externen Spacer drei, im kleineren zwei längere homologe Regionen identifiziert werden, die jeweils von direkt repetierten Elementen flankiert sind. In diese Regionen sind sechs kleinere repetitive Elemente eingestreut, die zusätzlich auch 5`wärts der ausgedehnten homologen Regionen auftreten. In Abb. 12 ist die komplexe Struktur der heterogenen Spacer-Region dargestellt.

Die erste Kopie der größten homologen Region von etwa 340 bp Länge beginnt im 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment bei Base 568 von der Hind III-Schnittstelle (+1) aus und reicht bis Base 912. Sie umfaßt 344 bp. Die zweite Kopie dieser Region mit 342 bp Länge beginnt bei Base 1017 und reicht bis Base 1359. Im größeren Klon pRV 5 existiert eine dritte Kopie dieser Region, die bei Base 1464 beginnt und bei Base 1806 endet und somit 342 bp umfaßt. In diese langen homologen Bereiche sind vier verschiedene kurze repetitive Elemente eingestreut, die auch noch an anderer Stelle im Spacer vorkommen. Abgesehen von den oben erwähnten eingestreuten repetitiven Elementen beträgt die Homologie des beschriebenen direkt repetierten Bereiches 100%. Rechnet man die Basenaustausche in diesen Elementen ein, beträgt die Homologie auf den gesamten Bereich

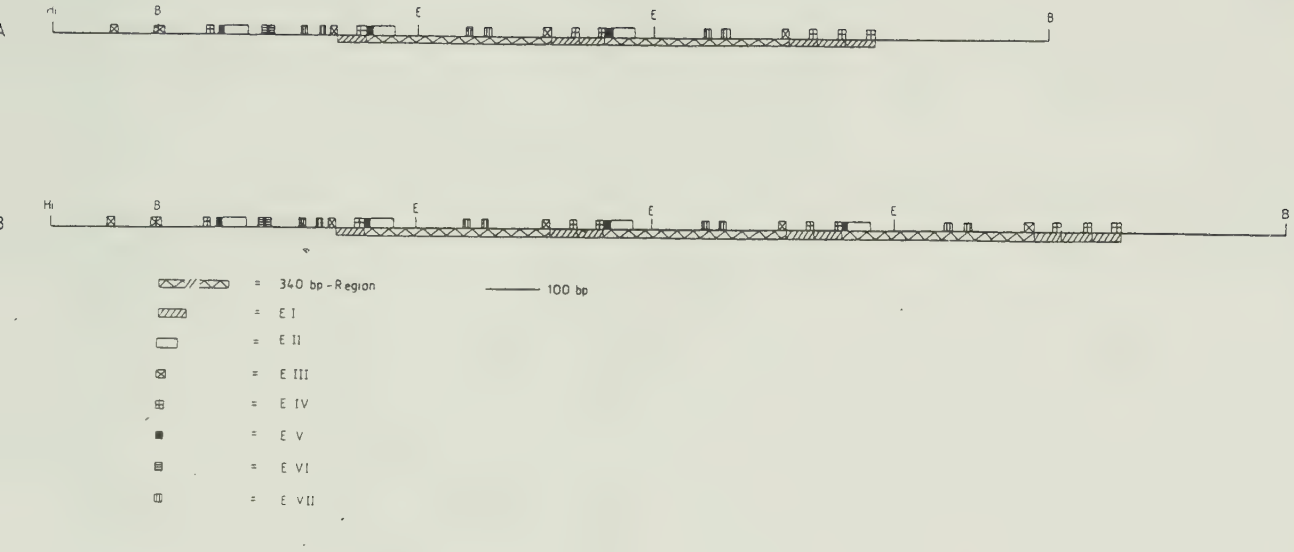


Abb. 12: Schematische Darstellung der komplexen Struktur der 5'externen Spacerregion der Mung-Bohne.
A: 5'externe Spacerregion mit einem 450 bp-Eco RI-Fragment
B: 5'externe Spacerregion mit zwei 450 bp-Eco RI-Fragmenten
Die einzelnen Elemente sind durch Symbole hervorgehoben.

bezogen 97%. Der Homologiegrad der kurzen repetitiven Elemente soll später genauer aufgeschlüsselt werden.

Die 340 bp langen, mehrfach vorkommenden Bereiche sind jeweils von 52 bp langen, direkt repetierten Elementen flankiert, die im folgenden als Element I bezeichnet werden. Am 3'Ende des 340 bp-Bereichs im 730 bp-Bam HI/Eco RI-Fragmentes liegen drei solcher Elemente als "direct repeats" vor, so daß im kleineren Spacer-Fragment sechs, im größeren acht Kopien dieses Elementes gefunden werden. Die Homologie dieser Elemente untereinander liegt bei jeweils über 90 %.

```
Kopie 1:TCCTGGCTCA GCCCTGACCA GGCAGGCGAT CATGTAGCGG CCCTTTTCGA A
Kopie 2:TCCTGGCTCA GCCCAGACCA GCCAGGTGGA CGTGTAGCGG CCCTTTTCGA A
Kopie 3:TCCTGGCTCA GCGCAGACCA GGCAGGCGGA CGTGTAGCGG CCCTTTTCGA A
Kopie 4:TCCTGGCTCA GCCCAGACCA GGCAGGCGAA CGTGTAGCGG CCCTTTTGGA A
Kopie 5:TCCTGGCTCA GCCCAGACCA GGCAGGCGGA CGTGTAGCGG CCCTTTTCGA A
Kopie 6:TCCTGGCTCA GCCCAGACCA GGCAAGCGTA CTTGTTGCGG CCCTCTATTC G
        1          11          21          31          41          51
```

Kopie 5 = Konsensus-Sequenz

Kopie 1: 90% Homologie

Kopie 2: 90% Homologie

Kopie 3: 96% Homologie

Kopie 4: 92% Homologie

Kopie 6: 83% Homologie

Abb. 13: Vergleich der Sequenzen der Elemente I, die als direkte Repeats die 340 bp-Regionen flankieren (vgl. Abb. 11 und 12). Die Numerierung der Kopien bezieht sich auf die Spacerregion mit einem 450 bp-Eco RI-Fragment.

Das letzte 52 bp-Element weist allerdings nur noch einen Homologiegrad von insgesamt 83% auf, wobei zu berucksichtigen ist, daß die erste Hälfte (24 bp) dieses Elementes zu 100% mit der Konsensus-Sequenz übereinstimmt, während die zweite Hälfte (29 bp) nur noch zu 68% homolog ist (Abb. 13).
Die kurzen repetitiven Elemente, die in den Spacer-Bereich eingestreut sind, werden als Elemente II-VII bezeichnet (Abb. 14).

Jeweils kurz nach Beginn der 340 bp-Region findet sich das etwa 40 bp große Element II, das zusätzlich bei Base 311 beginnend im 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment vorkommt. Die beiden Elemente in den großen homologen Bereichen sind vollkommen identisch, während das zusätzlich vorkommende Element eine Homologie von 70% aufweist. Anhand des Elementes II, das 5`wärts der großen homologen Regionen liegt, lassen sich innerhalb dieses Elementes drei Blocks identifizieren, die zu nahezu 100% konserviert sind. Diese Blocks sind durch kurze 2-3 bp Sequenzen getrennt, deren Sequenz nicht konserviert zu sein scheint (Abb. 14A). Auch diese Elemente liegen direkt repetiert vor.
Element III mit einer Konsensus-Sequenz von 14 bp (Abb. 14B) tritt jeweils am Ende der 340 bp-Region auf, eine Kopie liegt außerdem vor dem ersten flankierenden 52 bp-Element, eine weitere Kopie wurde im 185 bp-Bam HI/Hind III-Fragment bei Base 101 gefunden, und möglicherweise kann auch noch ein Sequenzelement, das von Base 170 bis Base 196 reicht und verwandte Blocks aufweist, zu dieser Kategorie gezahlt

werden. Es existieren also sechs bzw. sieben, wieder direkt repetierte Elemente III im heterogenen Spacer-Bereich. Auch in diesem Fall sind die Elemente III, die in den 340 bp-Regionen liegen, zu 100% identisch. Das Element III, das vor dem ersten flankierenden 52 bp-Element liegt, weist einen Basenaustausch gegenüber den Elementen in den 340 bp-Regionen auf und ist damit zu 93% mit diesen homolog. Die 5`wärts davon gelegenen Elemente III zeigen eine geringere Homologie von 65% (Base 101) bzw. 72% (Base 170), wobei allerdings bei der Kopie, die bei Base 170 beginnt, eine Insertion von 8 bp unberücksichtigt bleibt. Stark konserviert sind bei diesem Element ein Block von fünf Thymidinresten, dem die Basen CA vorgestellt sind, und der durch eine kurze CG-reiche Sequenz von einem Block mit vier bis sechs Adeninresten getrennt ist.

Element IV (Abb. 14C) tritt jeweils am Ende jedes die 340 bp-Regionen flankierenden 52 bp-Elementes auf und hat zusätzlich eine Kopie von Base 277 bis 288. Es existieren somit sieben bzw. neun Kopien dieses Elementes im heterogenen Spacer. Das Element ist sehr konservativ, alle Kopien sind vollkommen identisch. Auch in diesem Fall handelt es sich um ein direkt repetiertes Sequenz-Element.

Element V (Abb.14D) kommt jeweils am Beginn jeder 340 bp-Region vor und tritt außerdem bei Base 299 auf. Es existieren somit drei bzw. vier Kopien im 5`externen rDNS-Spacer, die ebenfalls immer direkt repetiert sind. Die Konsensus-Sequenz dieses Elements hat eine Länge von 11 bp. Das Element V, mit dem die erste 340 bp-Region beginnt, entspricht dieser

Konsensus-Sequenz, hat aber ein um zwei Guaninreste verlängertes G-Cluster. Element V/1, das bei Base 299 beginnt, weist eine Basendeletion auf, was zu einer Homologie von 91% führt. Element V/3 in der letzten 340 bp-Region hat vier Basen ausgetauscht und ist damit nur noch zu 64% homolog mit der Konsensus-Sequenz.

Element VI (Abb. 14E) existiert in jedem Fall nur zweimal im 5'externen Spacer der rDNS, die beiden völlig identischen Kopien liegen als "direct repeats" unmittelbar nebeneinander, wobei die erste Kopie bei Base 377 beginnt.

Das letzte der fünf repetitiven Elemente, Element VII (Abb.14F) tritt im kleineren Spacer-Fragment sechsmal, im größeren insgesamt achtmal auf. Je zwei dieser Elemente liegen zentral in den 340 bp-Regionen, zwei weitere Kopien sind diesen Regionen vorgeschaltet und liegen bei Base 451 und Base 484. Auch die 10 bp- bzw. 15 bp- Kopien von Element VII sind immer direkt repetiert. Die beiden vorgeschalteten Kopien und die jeweils erste Kopie dieses Elements in der 340 bp-Region sind zu 100% identisch, die jeweils zweiten Kopien innerhalb der 340 bp-Region sind ebenfalls zu 100% identisch, verfügen auch über die gleiche Konsensus-Sequenz wie die 10 bp-Kopien dieses Elements, haben aber fünf zusätzliche Basen inseriert, was den Homologiegrad zwischen der 10- und 15 bp-Elemente auf 66% reduziert.

A

Element II

```
Kopie 1: ACACTCCTCT CCGCACGCCA GCTTCTGCTC ACTT.GGCTG GCGT

Kopie 2: AG.CAGCTCT CC..ACGCCA GTTTGA.CTC ACTTTGGCTG GCGT

Kopie 3: AG.CAGCTCT CC..ACGCCA GTTTGA.CTC ACTTTGGCTG GCGT
         1         11         21         31         41
                   └─────┘    └─────┘    └──────────┘
                  Block 1    Block 2      Block 3
```

B

Element III

Konsensus-Sequenz:

```
                                          CATTTTTCCG AAAA
                                          1         11
```

```
Kopie 1: ...TTTT... .GGAAAAAA             65% Homologie

Kopie 2: CATTTTTCTA AGGAAAAAA             72% Homologie (ohne 8bp-
                                                         Insertion)
                  ATCCCTGC

Kopie 3: CATTTTTCC. .G.AAAA              100% Homologie

Kopie 4: CATTCTTCC. .G.AAAA               93% Homologie

Kopie 5: CATTCTTCC. .G.AAAA               93% Homologie
```

C

Element IV

alle Kopien 100% homolog mit der Konsensus-Sequenz:

```
GCCCTTTCG AA
1        11
```

D

Element V	Konsensus-Sequenz:
	TATATGGGGG G 1 11
Kopie 1: TATA.GGGGG G	91% Homologie
Kopie 2: TATATGGGGG G(GG)	100% Homologie
Kopie 3: TAT..GCAGG G(GG)	64% Homologie

E

Element VI

Beide Kopien entsprechen der Konsensus-Sequenz

TGTGGGCGT
1

F

Element VII	Konsensus-Sequenz
	TTCTCGACCC 1
Kopie 1: TTCTC..G.A ..CCC	100% Homologie
Kopie 2: TTCTC..G.A ..CCC	100% Homologie
Kopie 3: TTCTC..G.A ..CCC	100% Homologie
Kopie 4: TTCTCTCGCA TGCCC	66% Homologie
Kopie 5: TTCTC..G.A ..CCC	100% Homologie
Kopie 6: TTCTCTCGCA TGCCC	66% Homologie

Abb. 14: Vergleich der Sequenzen der kurzen repetitiven Elemente aus der 5'externen Spacerregion der Mung-Bohne (vgl. Abb. 11 und 12). Bezüglich der Nummerierung der Kopien siehe Abb. 13.
A: Element II
B: Element III
C: Element IV
D: Element V
E: Element VI
F: Element VII

Diese Darstellung zeigt, daß der 5`externe rDNS-Spacer der Mung-Bohne einen sehr komplexen Aufbau aus drei größeren und fünf kleinen repetitiven Elementen aufweist, die alle ausschließlich direkt repetiert sind.

Über die Funktion dieser Elemente können aufgrund von Sequenzvergleichen mit ähnlichen Elementen in rDNS-Spacern anderer Organismen, über deren Wirkungsweise bereits Informationen vorliegen, Vermutungen angestellt werden. Diese sollen in der Diskussion ausführlich erörtert werden.

3.3. Versuche zur Bestimmung des Transkriptions-Starts des rRNS-Precursor-Moleküls

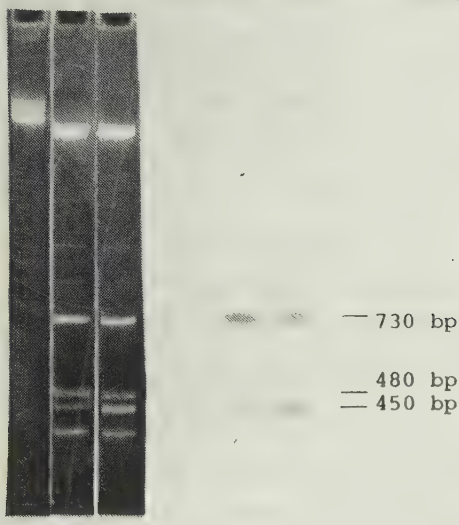
3.3.1. Hybridisierung mit Gesamtkern-RNS

Die Bestimmung des Startpunktes der rRNS-Transkription ist von großer Bedeutung, um einen Hinweis auf die Funktion der repetitiven Elemente im 5`externen Spacer der Mung-Bohne (siehe 3.2.) zu erhalten.

Dazu wurden die gesamten Nukleinsäuren aus Zellkernen isoliert, die Präparation einem DNase-Verdau unterzogen, und die verbleibende RNS mit ^{32}P-γ-ATP endmarkiert. Eine gelelektrophoretische Analyse dieser Gesamtkern-RNS zeigt, daß sie vorwiegend aus 18S und 25S ribosomaler RNS bestand, aber auch noch RNS-Arten aller anderen Größenklassen enthielt, so auch RNS-Moleküle, die größer als die 25S rRNS waren. Hierbei sollte es sich einerseits um die verschiedenen Messenger-RNS-Klassen handeln, andererseits sollten aber in dieser RNS-Präparation auch Vorläufer-Moleküle in verschiedenen Stadien des Processings der reifen ribosomalen RNS enthalten sein. Eine Hybridisierung von rDNS-Spacer-Fragmenten mit dieser markierten Gesamtkern-RNS könnte also Aufschluß darüber geben, ob die getesteten Fragmente zum transkribierten oder nicht-transkribierten Teil des rDNS-Spacers gehören.

Eine Hybridisierung der gesamten Inserts der Spacer-Klone pRV 4 und pRV 5 ergab eine Hybridisierungsantwort mit der Gesamtkern-RNS-Präparation. Um genauer aufzuschlüsseln, welche Teile des 5`externen Spacers transkribiert werden,

wurden die Klone pRV 4 und pRV 5 einem Doppelabbau mit Bam HI und Eco RI unterzogen und auf 2,5%igen Agarosegelen aufgetrennt. Zusätzlich wurde auch das 185 bp-Bam HI/Hind III-Insert aus pRV 6, das 5`wärts der Inserts aus pRV 4 und pRV 5 liegt, herausgeschnitten und analysiert. Die Hybridisierung mit Gesamtkern-RNS ergab eine starke Antwort des 730 bp-Bam HI/Eco RI-Fragmentes und des 450 bp-Eco RI-Fragmentes. Das 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment hybridisierte wesentlich schwächer, während das 185 bp Bam HI/Hind III-Fragment überhaupt keine Hybridisierungsantwort mehr aufwies (Abb. 15A, B, C u.D). Diese Ergebnisse legten nahe, daß der Transkriptions-Start irgendwo im 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment liegen könnte. Um die Transkriptionsinitiations-Stelle noch besser einzugrenzen, wurde das 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment mit der Restriktionsendonuklease Hae III abgebaut und die erhaltenen Fragmente wiederum auf einem hochprozentigen Agarosegel aufgetrennt. Aus diesem Abbau resultieren ein direkt an das 450 bp-Eco RI-Fragment anschließendes 110 bp-Eco RI/Hae III-Fragment, ein zentral liegendes 140 bp-Hae III-Fragment und ein 3`wärts des 185 bp-Bam HI/Hind III-Fragmentes gelegenes 230 bp-Bam HI/Hae III-Fragment. Die Hybridisierung mit Gesamtkern-RNS brachte eine starke Antwort des zentralen 140 bp-Hae III-Fragmentes, eine schwache Antwort des 230 bp-Bam HI/Hae III-Fragmentes und eine extrem schwache, oft nicht zu identifizierende Hybridisierung des 110 bp-Eco RI/Hae III-Fragmentes (Abb. 15C u. D). Dieses letztere Fragment ist in seiner Sequenz nahezu



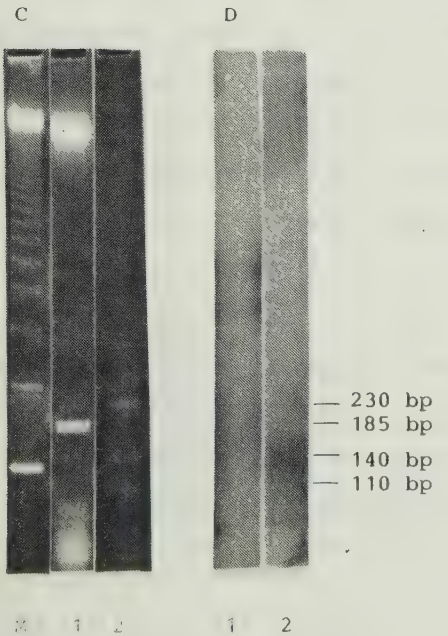


Abb. 15: Bestimmung der Transkriptionsinitiations-Stelle durch Hybridisierung mit Gesamtkern-RNS.

A: Gelbild des Restriktionsverdaus
Die Klone pRV 4 und pRV 5 wurden einem Doppelverdau mit Bam HI und Eco RI unterzogen. Die erhaltenen Fragmente wurden auf 2,5%igen Agarosegelen aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.
1: pRV 4, Bam HI/Eco RI-verdaut
2: pRV 5, Bam HI/Eco RI-verdaut
M: 123 bp-Leiter als Marker

B: Autoradiographie der Hybridisierung mit ^{32}P-endmarkierter Gesamtkern-RNS.
Die auf Nitrocellulose transferierten Restriktionsfragmente wurden mit ^{32}P-endmarkierter Gesamtkern-RNS hybridisiert.
Spuren siehe A

C: Gelbild des Restriktionsverdaus
Der Klon pRV 6 wurde mit Bam HI und Hind III doppelverdaut, das 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment wurde einem Verdau mit Hae III unterzogen. Die erhaltenen Fragmente wurden auf 2,5%igen Agarosegelen aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.
1: pRV 6, Bam HI/Hind III-verdaut
2: 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment, Hae III-verdaut
M: 123 bp-Leiter als Marker

D: Autoradiographie der Hybridisierung mit ^{32}P-endmarkierter Gesamtkern-RNS.
Die auf Nitrocellulose transferierten Restriktionsfragmente wurdem mit ^{32}P-endmarkierter Gesamtkern-RNS hybridisiert.
Spuren siehe C

vollständig homolog zu einem Teil des 450 bp-Eco RI-Fragmentes, das starke Hybridisierung mit der Gesamtkern-RNS zeigt. Es muß daher angenommen werden, daß die schwache, oft nicht erkennbare Hybridisierungsantwort des 110 bp-Eco RI/Hae III-Fragmentes nicht auf das Fehlen homologer RNS-Moleküle zurückzuführen ist, sondern auf die geringe Größe des Fragmentes, die ein zuverlässiges Haften an Nitrocellulose-Filtern anscheinend nicht mehr ermöglicht. So kann aus diesen Ergebnissen trotz der etwas widersprüchlichen Resultate bezüglich des kleinsten 110 bp-Eco RI/Hae III-Fragmentes geschlossen werden, daß der Transkriptions-Start des rRNS-Vorläufer-Moleküls im 230 bp-Bam HI/Hae III-Fragment lokalisiert ist, das zum Teil auch noch transkribiert wird.

3.3.2. Northern-Blots zur Bestimmung der Größe des (der) rRNS-Vorläufer-Moleküls(e)

Aus den in 3.3.1. dargestellten Ergebnissen kann noch nicht der genaue Startpunkt der rRNS-Transkription bestimmt werden; außerdem ist es nicht möglich zu entscheiden, ob sowohl die rDNS-Repetitions-Einheiten mit einem als auch die mit zwei 450 bp-Eco RI-Fragmenten im 5'externen Spacer transkribiert werden oder ob nur eine dieser Repeat-Klassen transkriptionsaktiv ist.

Um diese Fragen zu klären, d.h. die exakte Größe des (der) rRNS-Vorläufer-Moleküle zu bestimmen, wurde die über Saccharosegradienten gereinigte Gesamtkern-RNS auf denaturierenden Formaldehyd-Gelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Filter transferiert und schließlich mit ^{32}P-

nicktranslatierten DNS-Proben aus dem 5`externen transkribierten Spacer hybridisiert.

Die dabei erhaltenen hybridisierenden RNS-Fragmente waren alle wesentlich kleiner als die für ein intaktes Precursor-Molekül zu erwartende Größe. Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, daß intakte rRNS-Vorläufer-Moleküle unter den angewandten denaturierenden Bedingungen nicht stabil sind, da hierbei keine Stabilisierung des Moleküls durch Sekundärstrukturen möglich ist. Um einen möglicherweise doch verbleibenden Rest an intakten Vorläufer-Molekülen nachzuweisen, waren die gewählten Bedingungen nicht empfindlich genug.

Die erhaltenen Fragmente können möglicherweise als Ergebnisse des 5`Processings angesehen werden, aus denen aber auch Rückschlüsse auf die Größe des 5`externen transkribierten Spacer-Bereiches möglich sein sollten. Das dargestellte RNS-Agarosegel (mit Formaldehyd, Abb. 16A) zeigt, daß die ribosomalen RNS-Moleküle und deren Vorläufer aus Primärblätter-Präparationen etwas stabiler sind als die aus Hypokotyl-Präparationen. Nach Hybridisierung mit dem ^{32}P-nicktranslatierten Insert aus Klon pRV 4 erhielt man bei der Primärblätter-Präparation vier Fragmente mit einer Größe von ca. 2000 b, 900 b, 500 b und 250 b. Bei der Hypokotyl-Präparation konnten nur zwei kleinere Fragmente identifiziert werden (Abb. 16B). Da bei allen bisher untersuchten Eukaryonten der erste Processing-Schritt bei der Reifung des rRNS-Precursors das Entfernen der 5`nicht

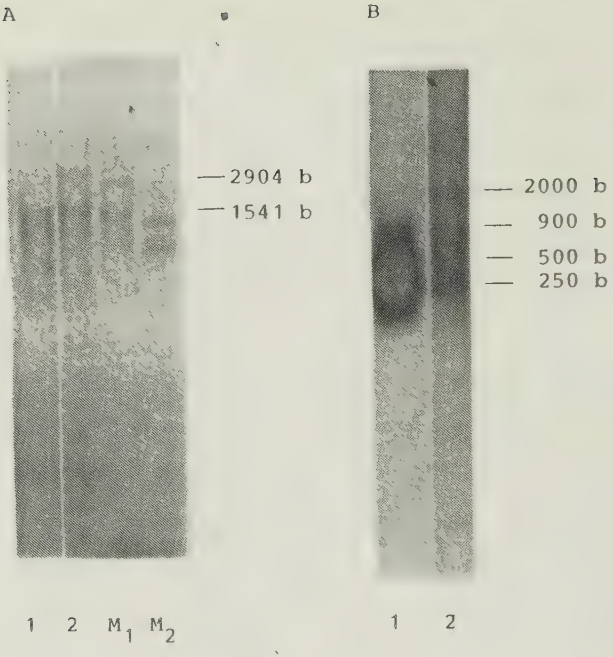


Abb. 16: Nachweis von rRNS-Precursor-Molekülen durch Northern-Blotting.

A: Gelbild der aufgetrennten Gesamtkern-RNS
Isolierte Gesamtkern-RNS aus Hypokotyl und Primärblättern wurde nach Denaturierung mit Formaldehyd und Formamid auf einem denaturierenden, Formaldehyd-haltigen, 1,3%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Toluidin-Blau gefärbt.
1: Gesamtkern-RNS aus Hypokotyl
2: Gesamtkern-RNS aus Primärblättern
M_1: 16S und 23S rRNS aus E. coli als Marker
M_2: 16S und 23S rRNS aus E. coli, nicht denaturiert

B: Autoradiographie der Hybridisierung mit einem 5'externen Spacer-Fragment
Die auf Nitrocellulose transferierte RNS wurde mit ^{32}P-nicktranslatiertem Insert aus pRV 4 hybridisiert.
Spuren siehe A

codierenden Bereiche ist, könnte das größte gefundene Fragment dem gesamten 5`nicht codierenden transkribierten Bereich entsprechen. Diese Region beginnt nach den in 3.3.1. dargestellten Ergebnissen etwa 120 bp 3`wärts der Bam HI-Schnittstelle des 480 bp Bam HI/Eco RI-Fragmentes, reicht von hier über den gesamten in 3.1. und 3.2. dargestellten, sequenzierten Bereich bis zur Bam HI-Schnittstelle am 3`Ende des 730 bp-Bam HI/Eco RI-Fragmentes und deckt dann noch weitere ca. 300 bp bis zum Beginn der für die 18S rRNS codierenden Region ab. In Repetitionseinheiten mit nur einem 450 bp-Eco RI-Fragment umspannt dieser Bereich etwa 1850 bp, in Repetitionseinheiten mit zwei 450 bp-Eco RI-Fragmenten beträgt seine Größe etwa 2300 bp. Unter Berücksichtigung einer gewissen Meßungenauigkeit entspricht das 2000 b-RNS-Fragment, das im dargestellten Northern-Blot nachgewiesen werden konnte, ungefähr der erwarteten Größe für einen 5`ETS-Bereich, der nur ein 450 bp-Eco RI-Fragment enthält. Für das Fehlen eines RNS-Moleküls, das einem 5`nicht-codierenden Bereich mit zwei 450 bp-Eco RI-Fragmenten entspräche, gibt es mehrere Erklärungen: Entweder werden tatsächlich nur die rDNS-Repetitionseinheiten transkribiert, die nur ein 450 bp-Eco RI-Fragment enthalten, während Repetitionseinheiten mit größerem 5`externen Spacer transkriptionsinaktiv sind, oder die Processing-Produkte dieser größeren Transkripte sind wesentlich instabiler als die der kleineren Precursor-Moleküle. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, daß die rDNS-Repeats mit zwei 450 bp-Eco RI-Fragmenten in wesentlich

geringerer Häufigkeit transkribiert werden als die kleineren rDNS-Repetitionseinheiten und ihre Transkriptionsprodukte daher mit den angewandten Methoden nicht nachgewiesen werden konnten. Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß der Hauptvertreter der genomischen rDNS, ein 10,5 kbp-Repeat, zwei dieser 450 bp-Eco RI-Fragmente im 5`externen Spacer besitzt.

Eine Aussage über die Bedeutung der kleineren erhaltenen RNS-Fragmente, die Hybridisierung mit 5`ETS-Sequenzen zeigen, ist sehr schwierig. Mit großer Wahrscheinlichkeit müssen sie als Abbauprodukte des 5`nicht codierenden Bereichs des rRNS-Vorläufer-Moleküls angesehen werden.

Bei der Interpretation der oben dargestellten Ergebnisse darf allerdings nicht unberücksichtigt bleiben, daß die erhaltenen, mit 5`externen Spacer-Sequenzen hybridisierenden RNS-Fragmente auch Zufalls-Bruchstücke des rRNS-Precursor-Moleküls sein könnten. Das Auftreten distinkter Banden würde in diesem Fall für die Existenz von Soll-Bruchstellen im rRNS-Vorläufer-Molekül sprechen, die aber unabhängig von Processing-Signalen wären. Aus der Größe solcher Fragmente könnten dann aber keine Schlüsse auf die Lage der Transkriptionsinitiations-Stelle bzw die Ausdehnung des 5`nicht-codierenden, transkribierten Bereiches gezogen werden.

3.3.3. Versuche zur Bestimmung des Transkriptions-Startpunktes mittels S_1-Mapping und Mapping mit Mung-bean-Nuklease

Die Kartierung von DNS/RNS-Hybriden mittels einzelstrangspezifischer Nukleasen ist eine gängige Methode zur exakten Bestimmung des Startnukleotids und von Processing-Stellen innerhalb der untersuchten RNS-Moleküle.

Hierzu wurde die über Saccharosegradienten gereinigte Gesamtkern-RNS mit ^{32}P-endmarkierten DNS-Fragmenten aus dem externen transkribierten Spacer hybridisiert, und die überhängenden einzelsträngigen DNS-Bereiche mit S_1-Nuklease oder Mung-bean-Nuklease abgebaut. Da der Transkriptions-Start aufgrund der beschriebenen Vorversuche im 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment vermutet wurde, wurde in den meisten Fällen dieses Fragment als Hybridisierungsprobe verwendet; zusätzlich als Kontrolle das 450 bp-Eco RI-Fragment. Die erhaltenen Ergebnisse waren sehr widersprüchlich, sowohl bei der Anwendung verschiedener Hybridisierungsbedingungen als auch bei Verwendung der beiden unterschiedlichen Enzyme. In manchen Experimenten schienen sowohl das 480 bp Bam HI/Eco RI- als auch das 450 bp-Eco RI-Fragment überhaupt nicht mit der eingesetzten Gesamtkern-RNS zu hybridisieren. Beide Fragmente waren daher einem Verdau mit den verwendeten Nuklease ungeschützt ausgesetzt. In anderen Fällen paarten beide erwähnten Fragmente vollständig mit der Gesamtkern-RNS, waren daher einem Abbau durch die DNasen nicht zugänglich und

blieben in ihrer ursprünglichen Größe erhalten. In einem dritten Teil der durchgeführten Experimente blieb jeweils ein Teil der eingesetzten markierten DNS-Fragmente in vollständiger Größe erhalten, während ein anderer Teil der Fragmente durch die eingesetzten Enzyme vollkommen abgebaut wurde. Nur in einem Fall gelang es, nach Hybridisierung des 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragmentes mit Gesamtkern-RNS und anschließendem Verdau mit S_1-Nuklease fünf geschützte Fragmente der Größe 375 bp, 200 bp, 180 bp, 160 bp und 90 bp zu identifizieren (Abb. 17). Das größte dieser Fragmente würde einem Transkriptions-Startpunkt etwa 110 bp 3`wärts der Bam HI-Schnittstelle und damit im 230 bp-Bam HI/Hae III-Fragment nahelegen und damit in guter Übereinstimmung mit den Daten aus der Hybridisierung mit Gesamtkern-RNS (3.3.1.) stehen. Dennoch müssen auch die Resultate aus diesem Experiment mit Skepsis betrachtet werden, da in einem Kontrollversuch das eingesetzte 450 bp-Eco RI-Fragment nicht mit der Gesamtkern-RNS hybridisierte und vollständig durch die S_1-Nuklease abgebaut wurde.

Eine mögliche Erklärung für das weitgehende Scheitern dieser Versuche ist die in 3.2. dargestellte komplexe Struktur der 5`externen Spacer-Region der Mung-Bohne, die aus zahlreichen repetitiven Elementen besteht. Bei nicht ganz optimaler Denaturierung der DNS-Fragmente könnte dieser Aufbau des Spacer-Bereichs die Bildung einer Sekundär-Struktur der Fragmente begünstigen und damit eine Hybridisierung mit Gesamtkern-RNS verhindern. Bei Paarung große

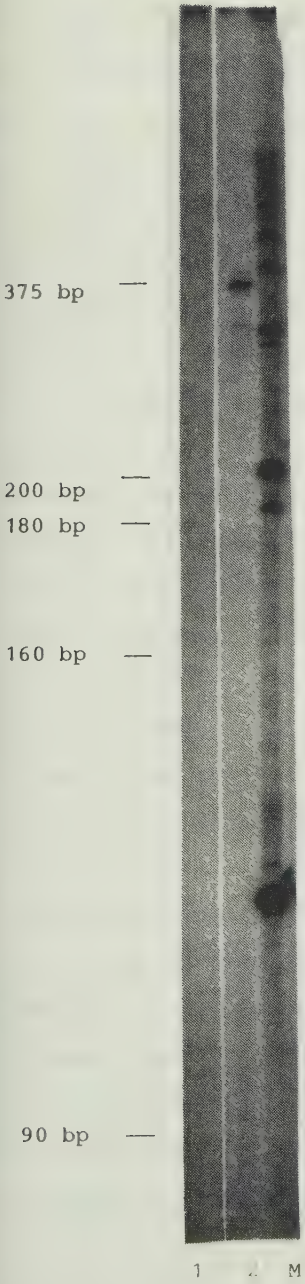


Abb. 17: Bestimmung der Transkriptionsinitiations-Stelle durch S_1-Mapping.
Das ^{32}P-endmarkierte 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment aus der 5'externen Spacerregion der Mung-Bohne wurde nach Hybridisierung mit Gesamtkern-RNS in Hybridisierungspuffer mit Na-TCA bei 45°C einem Verdau mit S_1-Nuklease unterzogen, die erhaltenen Fragmente auf einem denaturierenden 6%igen Polyacrylamid-Sequenziergel aufgetrennt und durch Autoradiographie nachgewiesen.
(Bei der Elution des 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragmentes wurde auch ein wenig vom 450 bp-Eco RI-Fragment mit eluiert.)
1: 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment, S_1-gemappt
2: 480 bp-Bam HI/Eco RI- und 450 bp-Eco RI-Fragment, ^{32}P-endmarkiert, nicht Nuklease-behandelt
M: 123 bp-Leiter, ^{32}P-endmarkiert, als Marker

einzelsträngiger Bereiche wären diese vor einem Nuklease-Verdau geschützt. bei der Bildung größerer "Loop"-Strukturen aus nicht gepaarten DNS-Bereichen würde das Fragment durch die Nuklease weitgehend abgebaut werden. Außerdem ermöglicht die repetitive Struktur des 5`externen Spacer-Bereichs eine Paarung von Gesamtkern-RNS-Sequenzen an verschiedenen Stellen der eingesetzten DNS-Fragmente, so daß die gepaarten Stellen nicht immer mit den Positionen übereinstimmen, von denen die entsprechende RNS-Sequenz in vivo transkribiert wurde. Auch diese "Falschpaarung" kann dazu führen, daß entweder ein zu großer oder ein zu kleiner Teil der zu kartierenden DNS-Fragmente von den verwendeten Nukleasen abgebaut wird. Ein weiterer Punkt ist die bereits bei den Northern-Blots aufgeführte mangelnde Stabilität der RNS-Moleküle unter denaturierenden Bedingungen. Ein Zerbrechen der RNS-Moleküle, die eigentlich mit komplementären DNS-Sequenzen paaren könnten, würde wiederum dazu führen, daß die DNS-Fragmente, die unter optimalen Bedingungen durch passende RNS-Sequenzen geschützt wären, einem Verdau durch S_1- bzw. Mung-bean-Nuklease zugänglich sind.

Der Transkriptions-Startpunkt des rRNS-Precursor-Moleküls kann aufgrund der dargestellten Ergebnisse mit großer Wahrscheinlichkeit im 230 bp-Bam HI/Hae III-Fragment lokalisiert werden, von dem aufgrund der Hybridisierungs-Ergebnisse angenommen wird, das es noch ungefähr zur Hälfte zum transkribierten Teil des rDNS-Spacers gehört. Die Entscheidung, ob sowohl der 5`externe Spacer mit einem als

auch der mit zwei 450 bp-Eco RI-Fragmenten transkribiert wird, kann unter Berücksichtigung der bisherigen Erkenntnisse nicht eindeutig getroffen werden.

3.4. Chromatinstruktur der ribosomalen Gene

3.4.1. Nuklease-Sensitivität des ribosomalen Chromatins

Untersuchungen über die Zugänglichkeit des ribosomalen Chromatins für DNase I sollten Aufschluß über die Chromatinverpackung der ribosomalen Gene im Allgemeinen geben.

Hierzu wurde isoliertes Chromatin mit DNase I unterschiedlich lange inkubiert. Die deproteinisierten Proben wurden anschließend mit Restriktionsenzymen nachgeschnitten und auf Agarosegelen aufgetrennt. Durch Hybridisierung mit ^{32}P-nicktranslatierten rDNS-spezifischen Proben konnten dann die zur rDNS gehörenden Fragmente identifiziert werden.

Abb. 18A zeigt ein Agarosegel, auf dem deproteinisierte DNS aus DNase I-behandeltem Chromatin, die mit Bam HI nachgeschnitten wurde, aufgetrennt wurde. In Abb. 18B ist die Hybridisierung der DNS-Fragmente mit dem ^{32}P-nicktranslatiertem Insert aus dem Spacer-Klon pRV 4 dargestellt. Bei Verwendung von 1 µg DNase I/µl ist nach 10minütiger Inkubationszeit der Hauptteil der genomischen DNS zu niedermolekularen Fragmenten abgebaut, während die rDNS-Bereiche noch vollständig erhalten sind. Die beiden prominenten Banden repräsentieren die heterogenen 5`externen Spacer-Regionen der Größe 2,1 kbp und 1,65 kbp. Bei den Primärblätter-Präparationen sind auch noch die Spacer-

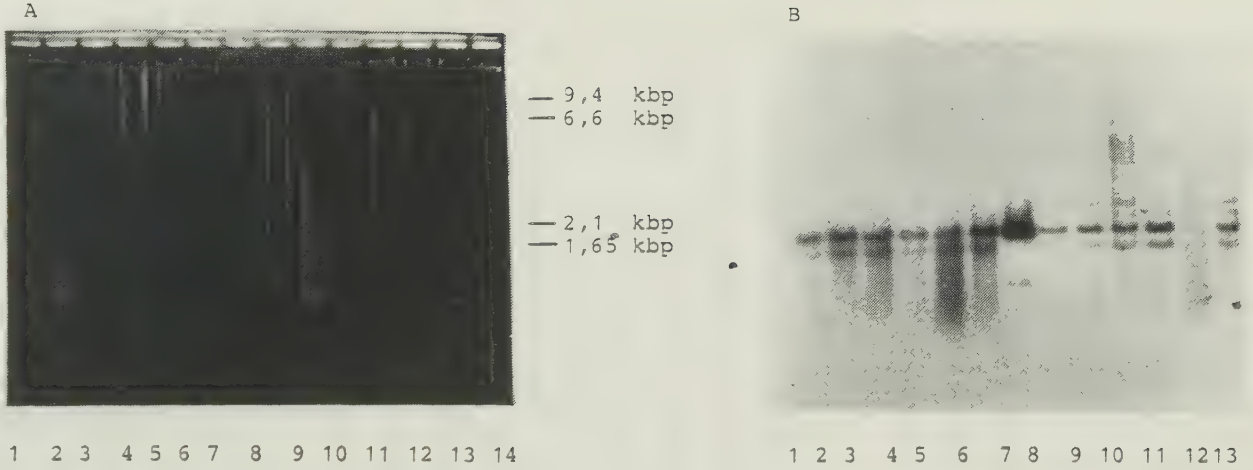


Abb. 18: Untersuchung der DNase I-Sensitivität von ribosomalem Chromatin.

A: Gelbild der DNS-Fragmente aus DNase I-behandeltem Chromatin aus Hypokotyl und Primärblättern der Mung-Bohne, die mit Bam HI nachgeschnitten wurden.
Isoliertes Chromatin wurde entsprechend den angegebenen Zeiten mit unterschiedlichen Konzentrationen von DNase I behandelt, deproteinisiert und die erhaltenen DNS-Fragmente mit Bam HI nachgeschnitten. Nach Auftrennung auf 1%igen Agarosegelen wurden die DNS-Fragmente mit Ethidiumbromid gefärbt.
1-6 DNS aus Hypokotyl
1,3: Inkubation 3 min
2,4: Inkubation 10 min
5: Inkubation 10 min ohne Zusatz von Nuklease
6: DNS aus nicht inkubiertem Chromatin
7: pRV 5, Bam HI-verdaut
8-13 DNS aus Primärblättern
Die Spuren 8-13 entsprechen den Spuren 1-6
14: λ -DNS, Hind III-verdaut, als Marker

B: Autoradiographie der Hybridisierung mit ^{32}P-nicktranslatiertem Insert aus pRV 4.
Die auf Nitrocellulose transferierten DNS-Fragmente wurden mit ^{32}P-

Bereiche der größeren rDNS-Repetitionseinheiten mit drei oder vier 450 bp-Eco RI-Fragmenten in vollständiger Größe zu erkennen. Das Fehlen des in Abb. 6 gezeigten 3'externen Spacers mit fünf 450 bp-Eco RI-Fragmenten beruht möglicherweise auf der geringeren Gesamtmenge an DNS in diesem Experiment.

Diese Versuche belegen, daß der größte Teil der rDNS gegen einen Abbau durch Nukleasen weniger sensitiv ist als die übrige DNS. Außerdem zeigt die Hybridisierung der DNS-Fragmente aus DNase I-behandeltem Chromatin, daß nicht eine bestimmte Repetitionseinheit besonders empfindlich oder außergewöhnlich resistent gegenüber einem Nukleaseverdau ist, sondern daß wohl alle heterogenen rDNS-Repeats durch ihre Chromatinverpackung einem Nukleaseabbau weniger zugänglich sind als das übrige Chromatin. Ein Hintergrund niedermolekularer rDNS-Fragmente, der bei diesen Experimenten jeweils auftritt, könnte auf unspezifisches Zerbrechen eines kleinen Teils der rDNS zurückgeführt werden. Möglich ist aber auch, daß eine Fraktion der rRNS-Gene in anderer Chromatinverpackung vorliegt als der Hauptteil der rDNS und dadurch empfindlicher auf einen Nukleaseabbau reagiert.

3.4.2. Untersuchungen zur Chromatin-Verpackung verschiedener Bereiche der rDNS-Repetitionseinheit

Durch diese Experimente sollte geklärt werden, ob aktiv transkribierte Bereiche der rDNS-Repetitionseinheit eine

andere Chromatinverpackung zeigen als nicht-transkribierte Spacer-Regionen.

Hierzu wurde isoliertes Chromatin mit Micrococcus-Nuklease verdaut, wobei eine Zeitkinetik aufgenommen wurde. Nach Deproteinisierung der einzelnen Proben wurden die erhaltenen DNS-Fragmente auf 2,5%igen Agarosegelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Filter transferiert und mit ^{32}P-nicktranslatierten DNS-Fragmenten aus verschiedenen Teilen der rDNS-Repetitionseinheit hybridisiert.

Es wurden jeweils vier identische Gele angelegt. Eines der DNS-Filter wurde bei diesen Experimenten jeweils mit linearisiertem, ^{32}P-nicktranslatiertem pBR 322 hybridisert. Diese Kontrollhybridisierung diente der Überprüfung der Spezifität der Hybridisierungsbedingungen. Die pflanzliche DNS auf diesen Kontroll-Filtern zeigte keinerlei Kreuzhybridisierung mit pBR 322, nur eine als Größen-Marker verwendete 123 bp-Leiter eines Kalbs-DNS-Satelliten erbrachte eine Hybridisierungsantwort (Abb. 19D). Die Hybridisierungsbedingungen konnten also als hinreichend spezifisch angesehen werden.

Als weitere Hybridisierungsproben wurden a) das 185 bp-Bam HI/Hind III-Fragment aus dem nicht-transkribierten Teil des rDNS-Spacers, b) das 450 bp-Eco RI-Fragment aus dem transkribierten Teil des rDNS-Spacers und c) ein 600 bp-Bam HI/Sal I-Fragment aus der für die 18S rRNS codierenden Region verwendet (Abb. 19A-D). Es zeigt sich dabei, daß bei den drei verschiedenen Hybridisierungen in jedem Fall ein

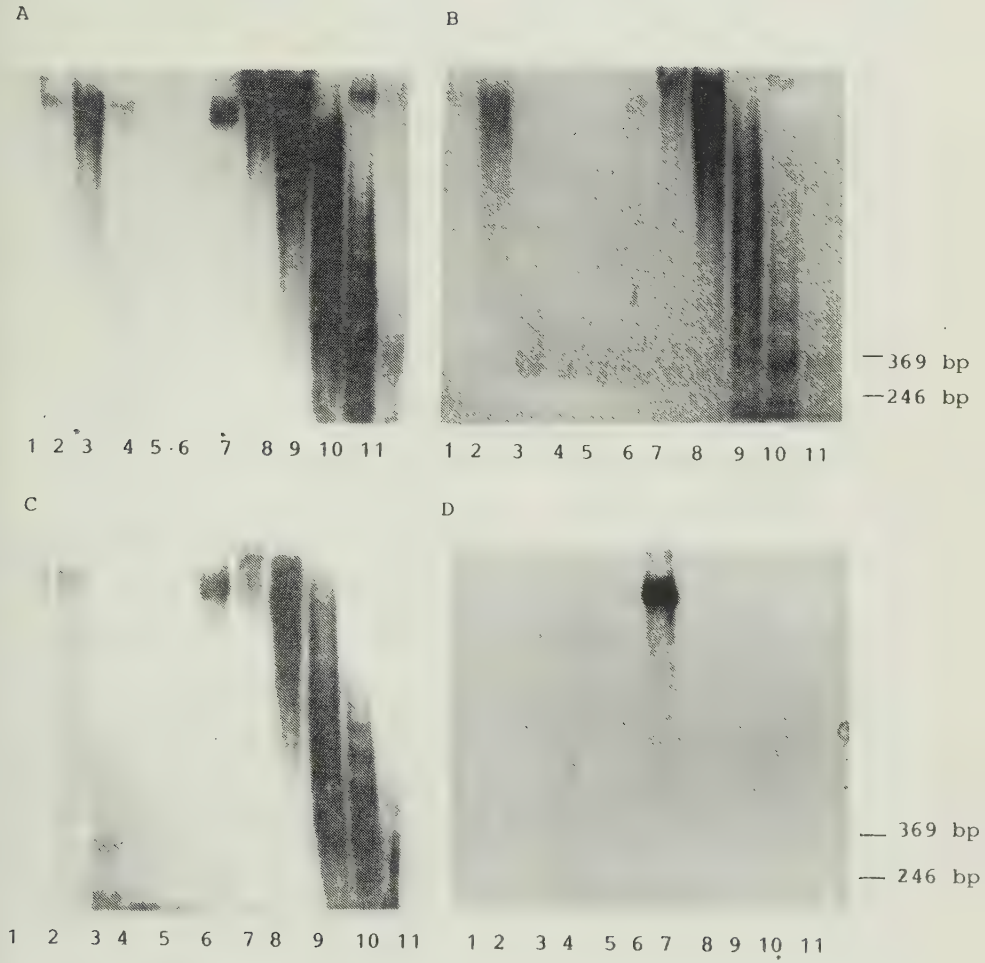


Abb. 19: Untersuchung der Chromatinverpackung einzelner Bereiche der rDNS-Repetitionseinheit.
Isoliertes Chromatin aus Hypokotyl und Primärblättern der Mung-Bohne wurde entsprechend den angegebenen Zeiten mit Micrococcus-Nuklease verdaut, deproteinisiert und auf 2,5%igen Agarosegelen aufgetrennt. Nach Transfer auf Nitrocellulose-Filter wurden die DNS-Fragmente aus vergleichbaren Gelen mit verschiedenen ^{32}P-nicktranslatierten Proben hybridisiert.

A: Autoradiographie der Hybridisierung mit dem ^{32}P-nicktranslatierten 450 bp-Eco RI-Fragment aus dem extern transkribierten Spacer.
1-5 DNS aus Hypokotyl
1: DNS aus unbehandeltem Chromatin
2: 5 min Inkubation
3: 10 min Inkubation
4: 15 min Inkubation
5: 30 min Inkubation
6: 123 bp-Leiter als Marker
7-11 DNS aus Primärblättern
die Inkubationszeiten entsprechen den Spuren 1-5

B: Autoradiographie der Hybridisierung mit dem ^{32}P-nicktranslatierten 185 bp-Bam HI/Hind III-Fragment aus dem NTS.
Spuren siehe A

C: Autoradiographie der Hybridisierung mit dem ^{32}P-nicktranslatierten 600 bp-Bam HI/Sal I-Fragment vorwiegend aus der für die 18S rRNS codierenden Region.
Spuren siehe A

D: Autoradiographie der Hybridisierung mit ^{32}P-nicktranslatiertem pBR 322 als Kontrolle.
Spuren siehe A

Nukleosomen-Muster auftritt. Die nicht Nuklease-behandelte Probe zeigt jeweils nur hochmolekulare DNS: bereits nach 1 min ist ein kleiner Teil der DNS aus allen Bereichen der rDNS-Repetitionseinheiten zu Tri-, Di- und sogar Monomeren der Nukleosomen abgebaut. Der größte Teil der DNS ist allerdings bei diesem Zeitwert noch hochmolekular. Nach 5 min ist der überwiegende Anteil der untersuchten DNS zu Trimeren, hauptsächlich aber bereits zu Di- und Monomeren der

Nukleosomen abgebaut. Nach 15 min findet man fast nur noch Di- und Monomere, nach 30 min nahezu ausschließlich monomere Nukleosomen. Allerdings ist zu erkennen, daß zwar der größte Teil der rDNS aus den verschiedenen Bereichen der Repetitionseinheit einem Micrococcus-Nuklease-Verdau zugänglich ist, wobei sich keine Unterschiede in der Kinetik zwischen transkribierten und nicht-transkribierten Bereichen zeigen. Dennoch verbleibt selbst bei langen Inkubationszeiten ein nicht unbeträchtlicher Rest der rDNS in hochmolekularem Zustand. Dieser Teil der rDNS scheint durch die Chromatin-Verpackung so geschützt zu sein, daß er einem Abbau durch Nukleasen nicht zugänglich ist (siehe 3.4.1.). Bei der Interpretation dieser Daten muß berücksichtigt werden, daß bei Pflanzen ein großer Teil der rRNS-Geneinheiten in vollkommen inaktiver Form als stark kondensiertes Chromatin vorliegt, während nur ein kleiner Teil der rDNS tatsächlich aktiv transkribiert wird. Ein abweichendes Chromatinmuster bestimmter Bereiche der rDNS-Repeats solcher aktiver Gene würde daher vermutlich beim vorgestellten Experiment immer durch das gleichmäßige Chromatinmuster der transkriptionsinaktiven Gene überdeckt werden.

4. Diskussion

Bei den meisten bisher untersuchten Organismen, sowohl Tieren als auch Pflanzen, besteht die Spacer-Region der rRNS-Gene, welche die einzelnen Transkriptionseinheiten trennt, aus mehreren unterschiedlichen Bereichen. Diese sind zum Teil aus verschiedenen repetitiven Elementen aufgebaut, ein anderer Teil weist auch eine singuläre Struktur auf. In vielen Fällen sind diese repetitiven Elemente für eine Längenheterogenität der rDNS verantwortlich, aber nur bei wenigen Organismen konnte ihnen bisher eine Funktion zugeordnet werden.

So existieren im rDNS-Spacer von Xenopus laevis drei Regionen mit unterschiedlichen repetitiven Elementen (Boseley et al.; Abb. 2). Für die Elemente in Region 0 und I konnte bisher keine Funktion aufgeklärt werden, aber die 60/81 bp-Elemente wurden als Enhancer identifiziert (Moss, 1983). Sie zeigen starke Homologie mit einem bestimmten Bereich des rDNS-Promotors und scheinen für die Bindung von Transkriptionsfaktoren verantwortlich zu sein (Dunaway u. Reeder, 1985). Auch in der rDNS-Spacer-Region von Drosophila existieren drei Bereiche mit verschiedenen repetitiven Elementen (Coen u. Dover, 1982). Die Funktion der unmittelbar an das Ende des Gens für die 28S rRNS anschließenden Region mit einem repetierten 90 bp-Element und die der folgenden Region mit einer 340 bp-Periode konnte bisher nicht geklärt werden. Die dritte Region, die etwa 100 bp 5`wärts des Transkriptionsstarts beginnt, ist aus einem 240 bp-Element aufgebaut, das Homologien zu dem Bereich des Promotors

aufweist, der den Transkriptionsstart umgibt. Die Situation ist hier vergleichbar mit der bei Xenopus; auch bei Drosophila scheinen diese Elemente einen transkriptionssteigernden Effekt zu haben, in dem sie als Transkriptionsinitiations-Signale fungieren und dadurch die Polymerase I-Konzentration im Bereich der Transkriptionsinitiations-Stelle erhöhen (Murtif u. Rae, 1985). Allerdings ist in diesem Fall keine additive Wirkung dieser 240 bp-Elemente auf eine Transkriptionssteigerung der rRNS nachgewiesen. Der Wirkungsmechanismus ist hier auch weniger offensichtlich als bei Xenopus. In anderen Fällen, in denen repetitive Sequenz-Elemente im rDNS-Spacer tierischer Organismen für eine Längenheterogenität dieser Geneinheiten verantwortlich sind, konnte diesen bisher keine Funktion zugewiesen werden.

Bei Pflanzen gibt es bis jetzt nur in einem Fall Hinweise auf eine Funktion der repetitiven Spacer-Elemente. Bei allen untersuchten Pflanzen wurde lediglich die Existenz solcher Elemente nachgewiesen und ihre Verantwortlichkeit für die Längenheterogenität der rDNS-Spacer festgestellt (Hemleben et al., 1987). Auch handelt es sich hier überwiegend nur um ein einziges repetitives Sequenz-Element, das meist die Spacer-Region 3`wärts des Gens für die 25S rRNS bis einige hundert Basenpaare 5`wärts des vermuteten Transkriptionsstarts aufbaut. Ein Beispiel für diese einfachen Sequenzelemente sind die 180 bp-Elemente im "NTS" der Erbse (Jorgensen et al., 1987). Beim Weizen dagegen finden sich zwei verschiedene

repetitive Elemente: zwei 150 bp-Elemente bilden die B-Region und eine größere, variable Anzahl von 135 bp-Elementen bauen die A-Region auf (Flavell et al., 1986; Lassner u. Dvorak, 1986). Die A-Region endet etwa 100 bp vor der putativen Promotor-Region, die den Transkriptionsstart des rRNS-Precursors beinhaltet. Die 135 bp-Elemente weisen kürzere Bereiche auf, die zu der von Flavell et al., (1986) postulierten Promotor-Sequenz homolog sind. Außerdem kann beobachtet werden, daß an den beiden rDNS-Hauptloci des Weizens auf den Chromosomen 1B und 6B die rRNS-Gene unterschiedlich stark exprimiert werden. Obwohl auf dem Chromosom 6B etwa doppelt so viele rRNS-Gene liegen wie auf Chromosom 1B (Flavell u. O`Dell, 1979), bilden die Gene am 1B-Locus einen wesentlich größeren Nukleolus als die am 6B-Locus (Martini u. Flavell, 1985). Das bedeutet, daß die 1B-Gene eine stärkere Transkriptionsaktivität zeigen als die rRNS-Gene am 6B-Locus. Da ein Teil der Gene am 1B-Locus eine größere Anzahl von 135 bp-A-Elementen besitzt (Flavell et al., 1986), nehmen die Autoren an, daß diese Elemente eine Enhancer-Funktion für die rRNS-Transkription haben. Eine vergleichbare Situation zeigt sich bei Hybridpflanzen mit rRNS-Genen vom Weizen und von Aegilops umbellulata. In diesen Pflanzen sind die rRNS-Gene von Aegilops umbellulata dominant über die rRNS-Gene des Weizens, die in solchen Hybriden nahezu vollständig reprimiert sind (Martini et al., 1982). Die ribosomalen Gene von Aegilops umbellulata haben eine längere Spacer-Region und damit mehr repetitive Elemente als

die des Weizens, was die oben ausgeführte Theorie eines Enhancer-Effektes für diese repetitiven Elemente bestätigen würde.

Bei der Mung-Bohne sind zwei Regionen im rDNS-Spacer deutlich zu unterscheiden. Die eine schließt sich fast unmittelbar an das 3`Ende des Gens für die 25S rRNS an und besteht aus 180 bp-Hpa II-Elementen. Die zweite Region grenzt 3`wärts an die 180 bp-Hpa II-Elemente an und reicht über den putativen Transkriptionsstart bis weit in den vermutlich transkribierten Bereich des 5`externen Spacers (vgl. Abb. 5). Die Heterogenität in dieser Region wird verursacht durch das ein- bzw. mehrfache Auftreten eines 450 bp-Eco RI-Fragmentes. Dieses Fragment liegt im kürzeren 5`externen Spacer (pRV 4) einmal, im längeren (pRV 5) zweimal vor. Hier soll ausschließlich der komplexere 5`wärts gelegene Teil des Spacers der Mung-Bohne betrachtet werden.

In der etwa 300 bp langen Region bis zum angenommenen Transkriptionsstart werden drei kurze Sequenzmotive (Elemente III, IV und V) gefunden, die im Verlauf des vermeintlich transkribierten Spacers noch mehrfach wiederholt sind. Direkt im Anschluß an die Transkriptionsinitiations-Stelle findet sich das Element II, das im transkribierten Spacer noch zwei- bzw. dreimal vorkommt. Etwa 70 bp nach dem Transkriptionsstart liegen die zwei GC-reichen 9 bp-Elemente VI direkt repetiert nebeneinander; 170 bzw. 180 bp 3`wärts des Transkriptionsstarts liegen je eines der 10 bp-Elemente VII, die im transkribierten Spacer-Bereich ebenfalls noch

mehrmals, immer direkt, repetiert sind. Etwa 220 bp nach Anfang des transkribierten Bereichs beginnen die größeren mehrfach repetierten Regionen, die im kürzeren 5`externen Spacer zweimal, im längeren dreimal vorkommen. Es handelt sich hierbei um 340 bp lange Bereiche, die jeweils von direkt repetierten Kopien des Elementes I flankiert sind. Innerhalb der 340 bp-Region treten die bereits erwähnten Elemente II III, IV und V jeweils einmal, das Element VII zweimal auf. Diese komplexe Spacer-Struktur ist in Abb. 12 und 13 zusammengefaßt.

Auf die Elemente II, IV und V, welche die putative Transkriptionsinitiations-Stelle umgeben, soll im Anschluß an diesen Teil der Diskussion ausführlich eingegangen werden.

Uber die Bedeutung und Funktion der übrigen repetitiven Elemente im hier dargestellten 5`externen rDNS-Spacer der Mung-Bohne können lediglich Spekulationen angestellt werden. Eine Möglichkeit wäre, daß diese Elemente als Teilbereiche des Promotors für die Bindung von Protein- und/oder anderen Faktoren verantwortlich sind, die für die Transkription durch die Polymerase I benötigt werden.

Bei der Kopie des Elementes III, die bei etwa -130 bezüglich des vermuteten Transkriptionsstarts liegt (Position 170 relativ zur Hind III-Schnittstelle am Beginn des sequenzierten Bereichs), läßt sich eine Homologie von 61% zu einer an entsprechender Stelle im rDNS-Spacer des Weizens liegenden Sequenz (Flavell et al., 1986) feststellen (Abb. 20). Die Autoren rechnen diesen Bereich des rDNS-Spacers zum

```
Mung-Bohne
Element III/2:        AA. GGAT.CCCTGC. AAAA
                        181          191      relativ zur Hind III-
                      **  ** * ** ***  ****   Schnittstelle
Weizen
Promotor-Element:     AAC GG.TGCCATGCG AAAA
                              GGCA
                     -131                      relativ zum putativen
                                               Transkriptionsstart
```

Abb. 20: Sequenzvergleich eines "Upstream-Promotor"-Elementes aus der rDNS des Weizens (Flavell et al., 1986) mit der zweiten Kopie des Elementes III aus der 5'externen Spacerregion der Mung-Bohne.

Polymerase I-Promotor und finden verwandte Sequenzen in den 135 bp-A-"Repeats" (s.o.). Außerdem konnten die Autoren wiederum eine schwache Homologie dieses Teils des rDNS-Promotors des Weizens zum entsprechenden Teil des rDNS-Promotors von Xenopus feststellen. Möglicherweise gehört also diese Kopie des Elementes III zum rDNS-Promotor der Mung-Bohne. Die anderen Kopien dieses Elementes, von denen eine 5'wärts des "Promotors", die anderen drei bzw. vier im transkribierten Teil des Spacers liegen, weisen eine Deletion von 8 bp gegenüber dem vermeintlichen Promotorelement auf (Abb. 14A), was die Homologie zu den entsprechenden Regionen aus Weizen und Xenopus praktisch zunichte macht. Man könnte

annehmen, daß diese Kopien den repetierten Promotor-Bereichen von Weizen, Xenopus und Drosophila entsprechen und ebenfalls eine Enhancer-Funktion für die Transkription durch DNS-Polymerase I haben. Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß diese Elemente wesentlich kürzer sind als die repetierten Bereiche im rDNS-Spacer der erwähnten anderen Organismen und außerdem nur eine Kopie 5`wärts des vermuteten Promotors liegt. Die anderen Kopien befinden sich im wahrscheinlich transkribierten Bereich des Spacers. Die Wahrscheinlichkeit, daß es sich bei diesen Kopien des Elementes III um ein Enhancer-Element vergleichbar denen der angeführten anderen Organismen handelt, ist aus den genannten Gründen relativ gering.

Von Element VI (Abb. 14D) existieren in den beiden heterogenen Spacern der Mung-Bohne etwa 70 bp 3`wärts des Transkriptionsstarts nur jeweils zwei direkt benachbarte Kopien. Auffallend an diesem Element ist sein GC-Reichtum (70%). GC-reiche Elemente mit einer bestimmten Konsensus-Sequenz (Abb. 21) wurden bereits als virale und zelluläre Enhancer für Gene, die durch Polymerase II transkribiert werden, identifiziert (Laimis et al., 1983). Element VI zeigt eine gewisse Übereinstimmung mit dieser Konsensus-Sequenz (Abb. 21). Allerdings kann allein aufgrund des GC-Reichtums und einer schwachen Homologie mit bekannten Polymerase II-Enhancer-Elementen nicht entschieden werden, ob auch Element VI Enhancer-Funktion ausübt, zumal keine homologen Sequenzen an vergleichbaren Positionen in der rDNS anderer

```
Enhancer-Elemente Polymerase II
Konsensus-Sequenz:                [ CGTGG AAAGGC ]
                                    T     TTT
                                    *****   *
Mung-Bohne, Element VI              TGTGGGCGT
```

Abb. 21: Sequenzvergleich der Konsensus-Sequenz von Polymerase II-Enhancer-Elementen (Laimis et al., 1983) mit Element IV aus der 5'externen Spacerregion der Mung-Bohne.

Organismen gefunden wurden. Zwar existieren im vermeintlich transkribierten Teil des rDNS-Spacers von Raphanus sativus (D. Delcasso-Tremousaygue, F. Grillet, F. Panabieres, M. Delseny, unveröffentlichte Daten) bei etwa +120 (+1 putativer Transkriptionsstart) drei etwa 10 bp lange, direkt repetierte Elemente; diese weisen aber ebenfalls keine Sequenzhomologien mit Element VI aus dem rDNS-Spacer der Mung-Bohne auf. Wie bereits erwähnt, sind Enhancer-Elemente für Polymerase I bisher nur als separat wiederholte Teilbereiche des eigentlichen Genpromotors identifiziert worden (Xenopus, Drosophila, Weizen; s.o.). Ob überhaupt kurze Enhancer-Sequenzen für diese Polymerase existieren, die Element VI vergleichbar wären, ist bisher nicht bekannt.

Für Element VII, das zweimal 5`wärts der längeren homologen Regionen und vier- bzw. sechsmal innerhalb der 340 bp-Bereiche auftritt, gibt es keinerlei Anhaltspunkte für eine Funktionalität. In diesem Fall konnten auch keine Sequenzhomologien mit Elementen aus rDNS-Spacern oder sonstigen funktionalen Elementen festgestellt werden.

Eine weitere Denkmöglichkeit wäre, daß solche Elemente im transkribierten Teil des Spacers eine Funktion als Processing-Signale ausüben, die bei der Degradierung des 5`externen, nicht codierenden Anteils des rRNS-Vorläufer-Moleküls benutzt werden. Da aber keinerlei Daten über Konsensus-Sequenzen derartiger Erkennungsstellen für RNasen vorliegen, muß dies eine bloße Vermutung bleiben.

Als Funktion für die Elemente I, welche die 340 bp-Regionen als direkte "Repeats" flankieren, kommt möglicherweise die Beteiligung an ungleichen Crossing-overs in Frage, die für die Erhaltung der Sequenz von genomischen DNS-Elementen verantwortlich gemacht werden, auf die kein unmittelbarer Selektionsdruck ausgeübt wird. Diese "Cross-over-Fixierung" (Smith, 1976) scheint bei der Aufrechterhaltung gleicher Repetitionseinheiten z.B. von Satelliten-DNS eine Rolle zu spielen. Vergleichbare Struktureigentümlichkeiten wurden bisher bei keinem anderen Organismus im Spacer-Bereich der rRNS-Gene gefunden.

Die Entstehung dieser komplexen Struktur, in der die 340 bp-Region mit ihren flankierenden und den eingestreuten Elementen zwei- bzw. dreifach oder sogar noch häufiger

repetiert ist, könnte auf ungleiches Crossing-over während der Meiose oder auch der Mitose (allerdings nur bei Keimbahnzellen) zurückgehen (Smith, 1976). Dieser Vorgang, der auch für die Entstehung hochrepetitiver Satelliten-DNS diskutiert wird, könnte auch hier zu einer Vervielfachung dieser Region geführt haben. Der mangelnde Selektionsdruck aufgrund fehlender Funktion würde die eingestreuten Elemente weniger empfindlich gegen auftretende Mutationen machen und so eine Veränderung gegenüber dem funktionalen Ausgangselement erklären. Solche Sequenzveränderungen sind besonders bei den Elementen III, V und VII zu beobachten.

Ein abschließendes Urteil über die Funktionalität der beschriebenen Sequenzelemente kann erst gefällt werden, wenn durch Veränderung oder Deletion eines dieser Motive eine bestimmte Funktion, sei es Transkription oder Processing, ausfällt oder beeinträchtigt wird.

Detaillierte Studien über Lage und Aufbau von Promotor-Sequenzen liegen bisher für Gene vor, die von Polymerase II transkribiert werden. Hierbei handelt es sich um die Protein-codierenden Gene, von denen eine Messenger-RNS abgelesen wird, die dann im Cytoplasma in das entsprechende Protein translatiert wird. In diesen Promotoren treten zwei in der Evolution sehr konservative Elemente auf, die in fast allen bisher untersuchten Protein-codierenden Genen auch sehr weit entfernter Arten gefunden werden. Es handelt sich hierbei zum einen um die TATA-Box bei -20 bis -30 relativ zur Transkriptionsinitiations-Stelle (Corden et al., 1980) und

weiterhin um eine CAAT-Box (Benoist et al., 1980), die bei etwa -70 bis -90 liegt.

Auch für die 5S rRNS- und die t-RNS-Gene, die von Polymerase-III transkribiert werden, liegen einige Daten über die Promotor-Region vor. Bei diesen Genen liegen die Bereiche, die für die Transkriptionsinitiation verantwortlich sind, innerhalb der codierenden Regionen. Bei den Genen für die 5S rRNS bei Xenopus findet sich der Promotor, der etwa 30 bp lang ist und einen spiegelsymmetrischen Aufbau zeigt, ungefähr im mittleren Drittel der codierenden Region (Bogenhagen, 1985). Bei einigen bisher untersuchten t-RNS-Genen von Drosophila befindet sich eine für die Transkriptionsinitiation wichtige Region am 3`Ende des codierenden Bereiches und schließt vermutlich noch 3`flankierende Sequenzen mit ein (DeFranco et al., 1980).

Auch über die Promotor-Region der Polymerase I, die für die Transkription der ribosomalen Gene zuständig ist, liegen für einige Tiere und niedere Eukaryonten genaue Untersuchungen vor. Es wurden nicht nur die Startpunkte für die Transkription bestimmt, sondern in einigen Fällen auch die Funktionalität von vermeintlichen Promotor-Elementen durch Setzen von Mutationen und/oder Deletionen dieser Regionen nachgewiesen. Solche Daten liegen für die menschliche rDNS (Haltiner et al., 1986), die rDNS von Maus (Skinner et al., 1984), von Xenopus (Sollner-Webb et al., 1983), von Drosophila (Kohorn u. Rae, 1983), von Tetrahymena (Saiga et al., 1982) und Acanthamoeba (Kownin et al., 1985) vor. Bis

vor einigen Jahren wurde angenommen, daß die Promotor-Region für die Polymerase I sehr artspezifisch ist. Daher galt die Existenz speziesübergreifender Consensus-Sequenzen als unwahrscheinlich. Dennoch konnte in einigen Experimenten gezeigt werden, daß die artunabhängige Benutzung von Systemen für die in vivo- und in vitro-Transkription ribosomaler Gene nicht völlig ausgeschlossen ist. Die rDNS von Dytiscus wird beispielsweise in Xenopus-Oocyten (Trendelenburg et al., 1978) und klonierte Xenopus-rDNS in Maus-Zellextrakten (Wilkinson u. Sollner-Webb, 1982) transkribiert.

In letzter Zeit wurde auch für den Mais der Transkriptionsstart für die Polymerase I durch S_1-Mapping bestimmt (McMullen et al., 1986; Toloczyki u. Feix, 1986). Zusätzlich liegen unveröffentlichte Daten über die Sequenz der gesamten rDNS-Spacer-Region des Rettichs vor (D. Delcasso-Tremousaygue, F. Grellet, F. Panabieres, M. Delseny). Auch existieren Sequenzdaten der 3`externen Spacerregion von Cucumis sativus (Ganal, 1987), wobei der sequenzierte Bereich bis ca. 2,3 kbp 5`wärts der für die 18S rRNS codierenden Region reicht und die potentielle Transkriptionsinitiations-Stelle einschließt. Diese Daten konnten mit den bekannten Promotor-Regionen anderer Organismen verglichen werden. Auch die in dieser Arbeit vorgestellten Daten über die Sequenz des 5`externen Spacers der Mung-Bohne konnten in diesen Vergleich mit einbezogen werden. Dabei zeigte sich, daß die Elemente II, IV und V stark homologe Bereiche zur Transkriptionsinitiations-Stelle

der rDNS anderer Organismen aufwiesen. Eine Zusammenfassung aller vorliegender Daten über den Transkriptionsinitiations-Bereich der rRNS-Gene zeigt Abb. 22 (verändert und erweitert nach Skinner et al., 1984 bzw. Hemleben et al., 1987). Dieser Sequenzvergleich zeigt, daß zumindest die Region des Polymerase I-Promotors, welche die Transkriptionsinitiations-Stelle umgibt, in weiten Bereichen sehr stark konserviert ist, obwohl die untersuchten Organismen, außer den Säugern, keine eng verwandten Arten repräsentieren. In jedem Fall liegt vor dem Nukleotid, mit dem der transkribierte Teil des Spacers beginnt, ein Thymidin-Rest. Bei fast allen untersuchten Initiations-Stellen geht diesem durchgehend konservierten T ein AT-reiches Element voraus, das oft starke Ähnlichkeit mit der "TATA"-Box hat, die 20 bis 30 bp vor dem Transkriptionsstart der von Polymerase II transkribierten Gene liegt. Weiterhin zeigen die vorliegenden Daten bei Position -14 oder -15 einen Guanidin-Rest, der in diesem Abstand von 14 oder 15 bp zum Transkriptionsstart bei allen Organismen vorhanden ist. Der Bereich zwischen dem G-Rest bei -14 oder -15 und der "TATA"-Box scheint weniger konserviert und stärker artspezifisch zu sein. Dennoch fallen auch in dieser Region bei Drosophila, Tetrahymena, Acanthamoeba, der Mung-Bohne und weniger ausgeprägt auch beim Rettich ausgedehnte A-Kluster auf. Der transkribierte Spacer-Bereich beginnt bei allen untersuchten Organismen außer den Säugern mit etwa 10 bp langen Purin-Klustern, die bei den Pflanzen meist ausschließlich aus Guanidin-Resten bestehen. Dadurch

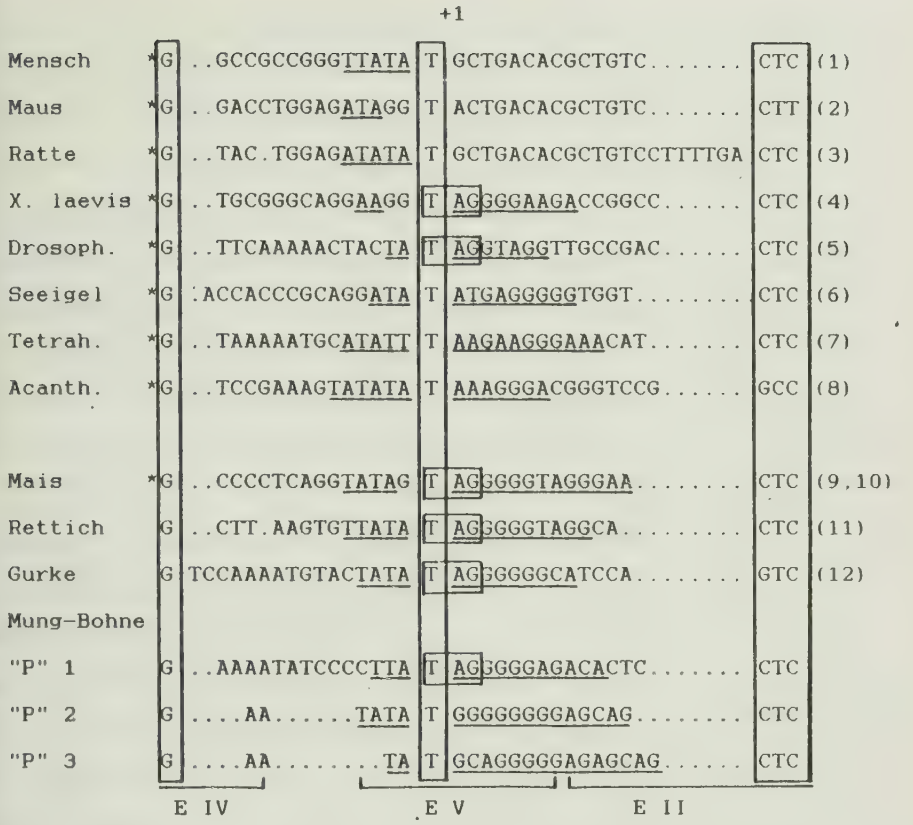


Abb. 22: Vergleich der rDNS verschiedener Organismen bezüglich der Sequenzen, die die Transkriptionsinitiations-Stelle für die Polymerase I umgeben.
Homologe Elemente sind durch Einrahmen bzw. Unterstreichen hervorgehoben.
Bei den durch * gekennzeichneten Organismen ist die Transkriptionsinitiations-Stelle durch S_1-Mapping oder durch Primer-Extension nachgewiesen.

(1) Haltiner et al., 1986
(2) Skinner et al., 1984
(3) Rothblum et al., 1982
(4) Sollner-Webb et al., 1983
(5) Kohorn u. Rae, 1983
(6) Ho u. Stafford, 1985
(7) Saiga et al., 1982
(8) Kownin et al., 1985
(9) McMullen et al., 1986
(10) Toloczyki u.Feix, 1986
(11) D. Delcasso-Tremousaygue, F. Grellet, F. Panabieres, M. Delseny, unveröffentlichte Daten
(12) Ganal, 1987

entsteht an vielen Transkriptionsinitiations-Stellen ein TAG-Triplett. Im Abstand von 10 bis 15 bp vom Beginn der Transkription an tritt fast durchgehend das Triplett CTC auf, das ebenfalls sehr konservativ zu sein scheint.

Aus diesem Sequenzvergleichen kann geschlosseen werden, daß Element IV, welches das konservierte G und ein A-Kluster enthält, Element V, in dem die "TATA"-Box, der konservierte T-Rest bei -1 und das G-Kluster liegen und zumindest der erste Teil von Element II, in dem das CTC-Triplett auftritt, bei der Mung-Bohne wichtige Bestandteile des Polymerase I-Promotors darstellen.

Wie bereits dargelegt, liegen diese Elemente mehrfach wiederholt im Spacer von Vigna radiata vor. Um entscheiden zu können, welche dieser Element-Kombinationen den eigentlichen Transkriptionsstart darstellen, können Sequenzvergleiche der drei Spacer-Positionen herangezogen werden, an denen die putativen Promotor-Elemente IV, V und II auftreten. Im 5`externen Spacer mit einem 450 bp-Eco RI-Fragment liegt diese Promotor-Konstellation dreimal, im Spacer mit zwei 450 bp-Eco RI-Fragmenten sogar viermal vor, wobei in diesem Fall zwei dieser Motive identisch sind. Abb. 22, in der die drei Positionen verglichen sind, zeigt, daß nur die erste Kopie dieser Element-Kombination im ersten Drittel des 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragmentes das konservierte Triplett TAG am Transkriptionsstart aufweist. Die anderen beiden Kopien zeigen an dieser Stelle die Tripletts TGG bzw. TGC. Noch überzeugender ist aber die Tatsache, daß nur bei dieser

ersten, am weitesten 5`wärts im Spacer gelegenen Position der drei Elemente, der offensichtlich in der Evolution stark konservierte Abstand von 13 oder 14 bp zwischen dem konservativen T an Position -1 und dem ebenfalls bei allen untersuchten Organismen auftretenden G an Position -14 oder -15 nachgewiesen werden kann. Die zweite Kopie dieser Elemente am 3`Ende des 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragmentes weist nur noch einen Abstand von 6 bp zwischen T und G auf, bei der dritten Kopie im 450 bp Eco RI-Fragment liegen sogar nur noch 4 bp zwischen den beiden konservierten Nukleotiden. Diese Konstellation muß als starkes Indiz dafür angesehen werden, daß der tatsächliche Transkriptionsstart im 230 bp-Bam HI/Hae III-Fragment am 5`Ende des 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragmentes lokalisiert ist.

Weiterhin müssen für die Entscheidung über die Lage der Transkriptionsinitiations-Stelle die in den Ergebnissen beschriebenen Daten berücksichtigt werden. Wie in 3.3.1. ausgeführt, zeigen das 450 bp-Eco RI- und das 730 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment starke Hybridisierung mit einer Gesamtkern-RNS, die auch das rRNS-Vorläufermolekül enthalten sollte. Das 5`wärts dieser Fragmente gelegene 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment, in dem die Kombination der Elemente IV, V und II am weitesten 5`wärts im externen Spacer auftritt, zeigt dagegen nur noch eine schwache Hybridisierungsantwort. Eine genauere Analyse dieses Fragmentes ergab für das 230 bp Bam HI/Hae III-Fragment, in dessen Mitte der putative Transkriptionsstart liegt, wiederum

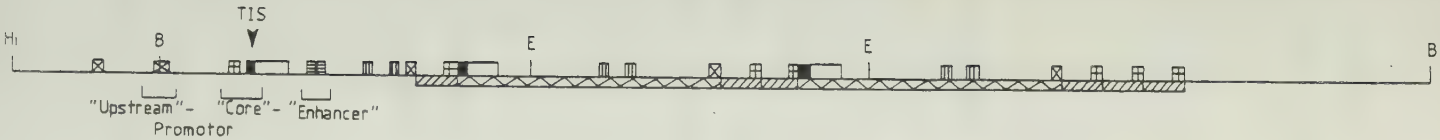
eine schwächere Hybridisierung als für die 3`wärts gelegenen Hae III- bzw. Eco RI/Hae III-Fragmente. Auch die Versuche, den Transkriptionsstart im 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment durch S_1-Mapping zu bestätigen, erbrachten ein 345 bp langes Fragment, das durch die RNS geschützt wurde. Wenn auch dieses Ergebnis aufgrund der in 3.3.3. dargelegten Tatsachen noch nicht sehr überzeugend ist, stimmt es doch gut mit einer Transkriptionsinitiations-Stelle etwa 130 bp 3`wärts der Bam HI-Schnittstelle überein. An dieser Stelle treten die jeweils ersten Kopien der möglichen Promotor-Elemente IV, V und II auf.

In 3.3.2. wurden Versuche beschrieben, die Größe des rRNS-Precursor-Moleküls durch Northern-Blots zu bestimmen. Das dabei erhaltene größte 2000 b-RNS-Fragment kann nicht dem gesamten Vorläufer-Molekül entsprechen, sondern könnte, wenn man davon ausgeht, daß es sich hierbei um ein Produkt des 5`Processings handelt, den gesamten 5`externen transkribierten Spacer repräsentieren. Bei rDNS-Repetitionseinheiten mit nur einem 450 bp-Eco RI-Fragment beträgt die Größe der transkribierten Spacer-Region etwa 1900 bp, bei Repetitionseinheiten mit zwei 450 bp-Eco RI-Fragmenten etwa 2350 bp. Das im Northern-Blot auftretende RNS-Fragment würde also dem kleineren 5`externen Spacer ab dem vermuteten Transkriptionsstart recht gut entsprechen. Es muß aber nochmals darauf hingewiesen werden, daß die mit Spacer-Sequenzen hybridisierenden RNS-Fragmente auch Zufalls-Bruchstücke darstellen könnten, aus denen dann keinerlei

Rückschlüsse auf die Größe des transkribierten Spacer-Bereichs möglich wären. Bereits früher wurden aber von Grierson und Loening (1974) die Größen von rRNS-Vorläufer-Molekülen der Mung-Bohne unter nicht denaturierenden Bedingungen bestimmt. Die Autoren fanden dabei zwei unterschiedlich große rRNS-Precursor-Moleküle. Ein $2,9 \times 10^6$ D (ca. 8,8 kb) großes Molekül in Blättern und ein $2,7 \times 10^6$ D (ca. 8,2 kb) großes in Wurzeln. Der Größenunterschied zwischen diesen beiden Molekülen entspricht interessanterweise annähernd den 450 bp, um die die beiden heterogenen 5`externen Spacer der Mung-Bohne divergieren. Nimmt man den Transkriptionsstart an der beschriebenen Position etwa 130 bp 3`wärts der Bam HI-Schnittstelle an und geht außerdem davon aus, daß die Transkription der meisten Vorläufer-Moleküle kurz hinter der für die 25S rRNS codierenden Region stoppt bzw. längere Transkripte sehr kurzlebig sind, errechnet sich für ein Transkript mit zwei 450 bp-Eco RI-Fragmenten eine Größe von etwa 8,7 kb, für eines mit nur einem 450 bp-Eco RI-Fragment die Größe von ca. 8,2 kb. Diese Größen stimmen sehr gut überein mit der von Grierson und Loening bestimmten Länge der Vorläufer-Moleküle. Die Ergebnisse der Autoren legen außerdem den Schluß nahe, daß sowohl die rDNS-Repetitionseinheiten mit großem 5`externen Spacer als auch die mit dem kleineren Spacer transkriptionsaktiv sind. Da beide über die gleiche Transkriptionsinitiations-Stelle verfügen, ist dies auch wahrscheinlich. Man müßte im anderen Fall annehmen, daß

entweder die geringere Anzahl der beschriebenen Elemente im kleineren Spacer die Transkription nicht ausreichend stimuliert, oder daß die höhere Zahl dieser Elemente im größeren Spacer die Transkription reprimiert. Für beide Annahmen gibt es bisher keine Anhaltspunkte. Ob die rDNS Repetitionseinheiten mit noch größerem 5`externen Spacern, die mehr als zwei 450 bp-Eco RI-Elemente besitzen, ebenfalls transkriptionsaktiv sind, kann im Moment nicht entschieden werden. Da sie in wesentlich kleinerer Anzahl als die Hauptvertreter in der rDNS vorhanden sind, könnten ihre Transkriptionsprodukte möglicherweise aufgrund der geringen Menge nicht mehr nachgewiesen werden. Trotz starker Indizien für einen Transkriptionsstart im 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß auch die beiden weiteren Sequenzelemente, die Ähnlichkeit mit der Transkriptionsinitiations-Stelle anderer Organismen haben (vgl. Abb. 22), als Startpunkt für die Polymerase I benutzt werden. Man könnte in diesem Zusammenhang erwägen, ob in verschiedenen Geweben oder Entwicklungsstadien der Pflanze unterschiedliche Promotoren, die möglicherweise auch in der Effizienz der Transkriptionsinitiation variieren, aktiv sind.

Die hier zusammengestellten Daten aus Sequenzvergleichen, aus eigenen Ergebnissen und aus Resultaten anderer Autoren lassen sich ausnahmslos mit einer Transkriptionsinitiations-Stelle im 480 bp-Bam HI/Eco RI-Fragment in Übereinstimmung bringen. Die Position dieses vermeintlichen Transkriptionsstarts in der rDNS der Mung-Bohne wird



= 340 bp-Region

100 bp

= E I

= E II

= E III

= E IV

= E V

= E VI

= E VII

Abb. 23: Übersicht über die möglichen Funktionen einiger direkt repetierter Elemente aus der 5'externen Spacerregion der Mung-Bohne.
Dargestellt ist die 5'externe Spacerregion mit einem 450 bp-Eco RI-Fragment.

flankiert von den putativen Promotor-Elementen IV, V und II, die starke Homologien zu den rRNS-Promotoren anderer Organismen aufweisen (vgl. Abb. 22).

Die möglichen Funktionen der repetitiven Elemente im 5`externen Spacer der Mung-Bohne sind in Abb. 2.1 zusammengefaßt.

Zahlreiche Untersuchungen haben sich mit der Chromatinstruktur sowohl proteincodierender als auch ribosomaler Gene beschäftigt, wobei das Hauptinteresse Unterschieden zwischen dem aktiv transkribierten Zustand und dem inaktiven Status galt. Hierbei wurde schon in frühen Studien deutlich, daß aktiv transkribierte Gene sensitiver sind gegenüber einem Verdau mit verschiedenen Nukleasen, wie z.B. DNase I oder Micrococcus-Nuklease (Bellard u. Gannon 1976; Weintraub u. Groudine, 1976). Daraus wurde geschlossen daß aktives Chromatin weniger dicht gepackt ist als inaktives und deshalb dem Abbau durch Nukleasen besser zugänglich ist. Für diese unterschiedliche Packungsdichte kommen verschiedene Ursachen in Betracht. Weintraub (1984) geht davon aus, daß das Histon H1 in aktivem Chromatin anders gebunden ist als in inaktivem. Der Autor diskutiert in diesem Zusammenhang eine Beteiligung von H1 an der Umlagerung reprimierter Gensequenzen in eine hochkondensierte, inaktive Chromatinstruktur. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die unterschiedliche Chromatinverpackung aktiver und inaktiver Gene ist eine Modifizierung verschiedener Chromatin-Proteine. So könnten z. B. stark acetylierte Histone (Davie u.

Saunders, 1981), ubiquitiniertes H2A (Levinger u. Varshavsky, 1982) oder das Auftreten von bestimmten Nicht-Histon-Proteinen (HMG 14 und 17; Egan u. Levy-Wilson, 1981 bzw. LP 30 und LP 32; Prior et al., 1983) für eine erhöhte Nuklease-Sensitivität des aktiven Chromatins verantwortlich sein. Auch wird ein verstärktes Auftreten der $H1^{o}$-Unterart von Histon H1 in inaktivem Chromatin angetroffen (Roche et al., 1985). Die angeführten Hypothesen schließen sich nicht aus; eine Modifizierung verschiedener Chromatin-Bestandteile könnte auch zu einer veränderten Bindung von Histon H1 führen.

Außer den erwähnten Daten deuten auch elektronenoptische Studien auf eine unterschiedliche Chromatinverpackung transkribierter und nicht transkribierter Gene hin. Unklar ist aber weiterhin, ob das Chromatin aktiver Gene eine Nukleosomen-Struktur aufweist oder nicht. So wurde in aktiv transkribierten Genen von Chironomus eine geringe Anzahl Nukleosomen-ähnlicher Partikel zwischen den entstehenden RNP-Partikeln gefunden (Lamb u. Daneholt, 1979). Leber u. Hemleben (1979a u. b) zeigen, daß ribosomales Chromatin, das mindestens teilweise transkriptionsaktiv sein sollte, nach Verdau mit Micrococcus-Nuklease bzw. DNase I ein vergleichbares Nukleosomen-Muster aufweist wie das übrige Chromatin. Im Gegensatz dazu finden Labhart et al. (1983) die aktiv transkribierten Gene im ribosomalen Chromatin von Xenopus oder Dictyostelium nukleosomenfrei. Auch Untersuchungen an amplifizierten rRNS-Genen in Oozyten

verschiedener Amphibien und Insekten sowie an der rDNS der Grünalge Acetabularia legen nahe, daß aktiv transkribierte rRNS-Gene wie auch die sie trennenden Spacer-Regionen nukleosomenfrei sind (Franke u. Scheer, 1978).

Unterschiedliche Ergebnisse erbrachten auch Studien über die Chromatinverpackung transkribierter und nicht transkribierter Bereiche innerhalb eines aktiven Gens. Wie erwähnt, finden Franke und Scheer (1978) nicht nur die transkribierten Bereiche, sondern auch die nicht transkribierten Spacer-Regionen aktiver ribosomaler Gene nukleosomenfrei. Die Ergebnisse bezüglich der rDNS von Xenopus werden von Labhart et al., (1983) bestätigt, während diese Autoren im Spacer aktiv transkribierter rRNS-Gene von Dictyostelium Nukleosomen finden. Die Autoren diskutieren als Ursache für diese divergierenden Resultate die unterschiedliche Anordnung der rRNS-Gene in den beiden Organismen. Während die ribosomalen Gene von Xenopus als Tandem-Repetitionseinheiten vorliegen, ist die auf Minichromosomen amplifizierte rDNS von Dictyostelium palindromisch angeordnet. In einer späteren Studie dieser Arbeitsgruppe (Sogo et al., 1984) über die Chromatinverpackung einzelner Bereiche einer aktiv transkribierten rDNS-Repetitionseinheit von Dictyostelium wurde versucht, die DNS mit Psoralen zu vernetzen. Dabei findet in den Protein-besetzten Nukleosomen-Regionen kein Cross-linking der DNS statt, sondern man erkennt blasenartige Strukturen. Bei diesen Experimenten fanden die Autoren ein extensives Cross-linking der DNS transkribierter Bereiche,

während die nicht transkribierte Spacer-Region ein regelmäßiges Blasen-Muster zeigt, das die Nukleosomen-Struktur widergibt.

Bei der Interpretation vorrangig von biochemischen Untersuchungen über die Chromatinstruktur ribosomaler Gene muß berücksichtigt werden, daß nur ein kleiner Teil der rRNS-Gene aktiv ist, während die übrigen Gene reprimiert sind. Dies trifft vor allem auf höhere Pflanzen zu, die teilweise bis über 10 000 Kopien der rDNS besitzen (Ingle et al., 1975). Die Nukleolus-Organisator-Region höherer Pflanzen besteht, wie bei Metaphase-Chromosomen des Mais gezeigt wurde (Givens u. Philips, 1976), einerseits aus einem heterochromatischen Bereich, in dem die inaktiven Gene lokalisiert sind, und zum zweiten aus einem dekondensierten, in der Interphase aktiv transkribierten Segment, das durch die sekundäre Einschnürung des Chromosoms repräsentiert ist. In der Interphase wird aus den Genen in der sekundären Einschnürung der Nukleolus gebildet, während die umgebenden inaktiven Gene weiterhin als hochkondensiertes Heterochromatin vorliegen. Allerdings werden auch innerhalb des Nukleolus in den sogenannten fibrillären Zentren (Stahl, 1982) reprimierte rRNS-Gene gefunden, die in kondensiertes Chromatin verpackt sind. Diese können aber, im Gegensatz zu den in hochkondensiertem Heterochromatin vorliegenden rRNS-Genen, die den Nukleolus flankieren, rasch dekondensiert und aktiviert werden und stehen dann zur Transkription zur Verfügung.

Die in 3.4.1. dargestellten Ergebnisse zur DNase I-Sensitivität ribosomaler Gene zeigen, daß der überwiegende Teil des ribosomalen Chromatins weniger sensitiv gegenüber dieser Nuklease ist als das restliche Chromatin. Nach Inkubationszeiten, nach denen das übrige Chromatin weitgehend zu niedermolekularen Bestandteilen abgebaut ist, sind die rDNS-Fragmente aus der transkribierten Spacer-Region immer noch vollständig erhalten. Hierbei ist keine Präferenz für eine bestimmte Repetitionseinheit zu erkennen, sondern sowohl die kleinere (ein 450 bp-Eco RI-Fragment) als auch die größere (zwei 450 bp-Eco RI-Fragmente) 5`externe Spacer-Region sind weitgehend resistent gegen DNase I. Die Spacer-Regionen der noch größeren rDNS-Repetitionseinheiten, deren Existenz in Abb. 5 gezeigt ist, scheinen nur in den Primärblättern von DNase I nicht angegriffen zu werden. Im Zusammenhang mit den dargelegten Daten anderer Autoren muß dies so gedeutet werden, daß die rRNS-Gene größtenteils inaktiv sind und eine höhere Verpackungsdichte des Chromatins aufweisen als die restliche DNS. Ein Hintergrund von rDNS-Fragmenten im niedermolekularen Bereich deutet daraufhin, daß ein Teil der rRNS-Gene weniger dicht verpackt vorliegt und damit zugänglicher für DNase I ist. Hierbei handelt es sich vermutlich um die aktiv transkribierten Gene. Diese Annahme wird durch die in 3.4.2. gezeigten Resultate bestätigt, die beweisen, daß ein Teil des ribosomalen Chromatins auch nach langen Inkubationszeiten mit Micrococcus-Nuklease, bei denen das weniger dicht verpackte ribosomale Chromatin bereits als

Di- oder Mononukleosomen vorliegt, noch in hochmolekularer Form verbleibt. Abb. 18 B zeigt, daß die größeren 5`externen Spacer-Regionen mit mehr als zwei 450 bp-Eco RI-Fragmenten nur in Chromatinpräparationen aus Primärblättern resistent gegen DNase I sind, während sie im Hypokotyl-Chromatin nach einem Verdau mit DNase I nicht mehr nachzuweisen sind. Dies könnte darauf hindeuten, daß diese Repetitionseinheiten im Hypokotyl als besonders aufgelockertes Chromatin vorliegen und dadurch sehr sensitiv gegen DNase I sind, während sie in Primärblättern eher heterochromatisch verpackt sind. Man könnte daraus schließen, daß diese großen Repetitionseinheiten im Hypokotyl transkriptionsaktiver sind als in Primärblättern. Allerdings darf nicht außeracht gelassen werden, daß auch die 0-Kontrolle der Hypokotylpräparationen, bei der keine Inkubation mit DNase I durchgeführt wurde, keine großen rDNS-Repetitionseinheiten zu enthalten scheint, obwohl deren Existenz auch im Hypokotyl in Abb. 6 nachgewiesen wurde.

Außerdem wurde in diesen Experimenten versucht, Aufschluß über die Chromatinverpackung der verschiedene Bereiche der ribosomalen Repetitionseinheit zu erhalten. In den dargelegten Versuchen konnte keine unterschiedliche Chromatinverpackung transkribierter und nicht transkribierter Bereiche der ribosomalen Gene nachgewiesen werden. Man muß nun aber berücksichtigen, daß ein Großteil der rDNS möglicherweise auch bei der untersuchten Mung-Bohne als hochkondensiertes Heterochromatin vorliegt, das einem Abbau

durch Nukleasen, nur sehr schwer, wenn überhaupt, zugänglich ist. Sollte dieser Teil der ribosomalen Gene durch die Micrococcus-Nuklease angegriffen werden, müßte man ein regelmäßiges Nukleosomen-Muster erwarten, das alle Bereiche der Repetitionseinheit betrifft. Ein zweiter Teil der rRNS-Gene liegt ebenfalls reprimiert und Nukleosomen-verpackt in den sogenannten fibrillären Zentren vor, um schnell aktiviert werden zu können. Auch dieser Teil der rDNS sollte ein regelmäßiges Nukleosomen-Muster ergeben. Nur bei einem kleinen Teil der ribosomalen Gene, der tatsächlich aktiv transkribiert wird, wäre eine unterschiedliche Chromatinverpackung transkribierter und nicht transkribierter Bereiche der rDNS-Repetitionseinheit zu erwarten. Die möglicherweise abweichende Chromatin-Struktur aktiver rRNS-Gene könnte durch die der inaktiven, nukleosomal verpackten Gene überdeckt werden.

Die Versuche zur Chromatin-Struktur zeigen, daß der größte Teil der rRNS-Gene als inaktives Heterochromatin vorliegt, das Nukleasen kaum zugänglich ist. Ob eine unterschiedliche Chromatinverpackung einzelner Genbereiche in aktiven pflanzlichen rRNS-Genen vorliegt, kann wahrscheinlich nur durch elektronenoptische Studien geklärt werden, da mit biochemischen Mitteln eine Differenzierung zwischen aktiven und inaktiven Genen nicht möglich ist.

In der vorliegenden Diskussion wurde die Funktion der einzelnen Sequenz-Elemente in der repetitiv organisierten 5`-externen Spacer-Region der Mung-Bohne erörtert. Weiterhin

wurden Sequenzhomologien im Bereich der Transkriptionsinitiations-Stelle bei allen ribosomalen RNS-Genen, bei denen die Sequenz dieser Region bekannt ist, gezeigt. Zusammen mit den oben diskutierten Ergebnissen der Untersuchungen zur Chromatinstruktur der ribosomalen Gene bei Vigna radiata geben diese Daten Hinweise auf die Regulation der Transkription der ribosomalen RNS bei der Mung-Bohne.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der 5`externen Spacer-Region der rDNS-Repetitionseinheit der Mung-Bohne (Vigna radiata).

Drei verschiedene Repetitionseinheiten der Größe 10 kbp, 10,5 kbp und 10,8 kbp wurden kloniert (pRV 1-3) und näher charakterisiert. Eine längenvariable Region liegt im 5`externen Spacer-Bereich und geht auf das ein- bzw. mehrfache Vorkommen eines 450 bp-Eco RI-Fragmentes zurück. Die 10 kbp-Repetitionseinheit besitzt ein, die 10,5 kbp- und die 10,8 kbp-Repetitionseinheiten enthalten je zwei solcher 450 bp-Eco RI-Fragmente.

Die Sequenzierung des 5`externen Spacers zeigt eine sehr komplexe Struktur dieses Bereichs. Eine 340 bp-Region ist zwei- (10 kbp-Repeat) bzw. dreimal (10,5 und 10,8 kbp-Repeats) repetiert und jeweils von den 52 bp-"direct repeats" des Elementes I flankiert. Sechs weitere kleinere Elemente (II-VII) kommen ebenfalls mehrfach wiederholt in der Spacer-Region vor. Element IV weist Ähnlichkeiten mit einem Polymerase II-Enhancer auf. Die Elemente II-V gehören mit großer Wahrscheinlichkeit zur Promotor-Region der rDNS. Dies konnte aufgrund von Sequenzhomologien mit den rDNS-Promotoren anderer untersuchter Organismen gezeigt werden. Diese vermeintlichen Promotor-Bereiche treten mehrfach in der 5`externen rDNS-Spacerregion der Mung-Bohne auf (zweimal in

der 10,0 kbp-, dreimal in den 10,5 kbp- und 10,8 kbp-Repetitionseinheiten).

Um Aufschluß über mögliche Promotor-Funktionen der repetitiven Elemente zu erhalten, wurden zusätzlich Untersuchungen zur Bestimmung des Transkriptionsstart-Punktes durchgeführt. Mittels Hybridisierungsexperimenten mit Gesamtkern-RNS, durch Northern-Blotting und auch durch S_1-Nuklease-Mapping konnten Anhaltspunkte über die Transkriptionsinitiations-Stelle gewonnen werden. Die so erhaltenen Ergebnisse wurden bestätigt durch bereits früher bestimmte Precursor-Größen (Grierson u. Loening, 1974) und durch Sequenzvergleiche mit bekannten Transkriptionsinitiations-Regionen aus der rDNS anderer Organismen.

Weiterhin wurden Studien zur Chromatinverpackung der rRNS-Gene durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß ein großer Teil der ribosomalen Gene als hochkondensiertes, Nukleasen kaum zugängliches Heterochromatin vorliegt, und nur der kleinere Teil vermutlich transkriptionsaktiver Gene als aufgelockertes Chromatin Nukleasen-sensitiv ist. Eine abweichende Chromatinverpackung einzelner Regionen der rDNS-Repetitionseinheit konnte nicht nachgewiesen werden, möglicherweise weil die Nukleosomen-verpackten inaktiven Gene derartige Unterschiede in den wenigen aktiven rRNS-Genen überdecken.

6. Literatur

Allet, B., Rochaix, J.D. (1979)
Structure analysis at the ends of the intervening DNA sequences in the chloroplast 23S ribosomal genes of C. reinhardii.
Cell, 18, 55-60

Andersen, A.H., Gocke, E., Bonven, B.J., Niesen, O.F., Westergaard, D. (1985)
Topoisomerase I has a strong binding preference for a conserved hexadecameric sequence in the promoter region of the rRNA gene from Tetrahymena pyriformis.
Nucl. Acids Res., 13, 1543-1557

Arnheim, N., Southern, E.M. (1977)
Heterogeneity of the ribosomal genes in mice and men.
Cell, 11, 363-370

Arnheim, N., Kuehn, M. (1979)
The genetic behaviour of a cloned mouse ribosomal DNA segment mimics mouse ribosomal gene evolution.
J. Mol. Biol., 134, 743-765

Appels, R., Gerlach, W., Dennis, E., Swift, H., Peacock, W. (1980)
Molecular and chromosomal organization of DNA sequences coding for the ribosomal RNAs in cereals.
Chromosoma, 78, 293-311

Appels, R., Dvorak, J. (1982)
The wheat ribosomal DNA spacer region: its structure and variation in populations and among species.
Theoret. Appl. Genet., 63, 337-348

Ashraf, M., Godward, M.B.F. (1980)
The nucleolus in the telophase, interphase and prophase.
J. Cell Sci., 41, 321-329

Bakken, A., Morgan, G., Sollner-Webb, B., Roan, J., Busby, S., Reeder, R.H. (1982)
Mapping of transcription initiation and termination signals on Xenopus laevis ribosomal DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 56-60

Bateman, E., Iida, C., Kownin, P., Paule, M. (1985)
Footprinting of ribosomal RNA genes by transcription initiation factor and RNA polymerase I.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 8004-8008

Bellard, M., Gannon, F., Chambon, P. (1977)
Nucleosome structure III:
The structure and transcriptional activity of the chromatin containing the ovalbumin and globin genes in chick oviduct nuclei.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 42, 779-791

Benoist, L., O'Hare, K., Breathnach, R., Chambon, P. (1980)
The ovalbumin gene sequence of putative control regions.
Nucl. Acids Res., 8, 127-142

Bird, A., Taggart, M., MacLeod, D. (1981)
Loss of the rDNA methylation accompanies the onset of ribosomal gene activity in early development of X. laevis.
Cell, 26, 381-390

Birnboim, H.C. (1983)
A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA.
Methods in Enzymol., 100, 243-255

Birnboim, H.C., Doly, I. (1979)
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucl. Acids Res., 7, 1513-1523

Bogenhagen, D.F. (1985)
The intragenic control region of the Xenopus 5S RNA gene contains two factor A binding domains that must be aligned properly for efficient transcription initiation.
J. Biol. Chem., 260, 6466-6471

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Green, P.J., Betlach, M.C., Heynecker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H., Falkow, S. (1977)
Construction and characterization of new cloning vehicles.
II. A multipurpose cloning system.
Gene, 2, 95-113

Borchsenius, S., Bonven, B., Leer, J.C., Westergaard, O. (1981)
Nuclease sensitive regions on the extrachromosomal r-chromatin from Tetrahymena pyriformis.
Eur. J. Biochem., 117, 245-250

Bos, J.L., Osinga, K.A., Van der Horst, G. Hecht, N.B., Tabak, H.F., van Ommen, G.-J., Borst, P. (1980)
Splice point sequence and transcripts of the intervening sequence in the mitochondrial 21S ribosomal RNA gene of yeast.
Cell, 20, 207-214

Boseley, P., Moss, T., Mächler, M., Portmann, R., Birnstiel, M. (1979)
Sequence organization of the spacer DNA in a ribosomal gene unit of Xenopus laevis.
Cell, 17, 19-31

Boyer, H., Roulland-Dussoix, D. (1969)
A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli.
J. Mol. Biol., 41, 459-472

Brand, R.C., Gerbi, S.A. (1979)
Fine structure of ribosomal RNA.
II. Distribution of methylated sequences within Xenopus laevis rRNA.
Nucl. Acids Res., 7, 1497-1511

Brown, D.D., Dawid, I.B. (1968)
Specific gene amplification in oocytes.
Science, 160, 272-280

Buongiorno-Nardelli, M., Amaldi, F., Lavasanchez, P.A. (1976)
Electrone microscope analysis of amplifying ribosomal DNA from Xenopus laevis.
Exp. Cell Res., 98, 272-280

Buttgereit, D., Pflugfelder, G., Grummt, I. (1985)
Growth-dependent regulation of rRNA synthesis is mediated by transcription initiation factor (TIF-A).
Nucl. Acids Res., 13, 8165-8180

Campell, G.R., Littau, V.C., Melera, P.W., Allfrey, V.G., Johnson, E.M. (1979)
Unique sequence arrangement of ribosomal genes in the palindromic rDNA molecules of Physarum polycephalum.
Nucl. Acids Res., 6, 1443-1448

Casey, J., Davidson, H. (1977)
Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentrations of foramide.
Nucl. Acids Res., 4, 1539-1552

Cassidy, B.G., Yang-Yen, H.-F., Rothblum, L.I. (1986)
Transcriptional role for the non-transcribed spacer of rat ribosomal DNA.
Mol. Cell. Biol., 6, 2766-2773

Cavanaugh, A.H., Thompson, E.A. (1983)
Hormonal regulation of transcription of rDNA.
J. Mol. Biol., 258, 9768-9773

Cavanaugh, A.H., Gokal, P.K., Lawther, R.P., Thompson, E.A. (1984)
Glucocorticoid inhibition of initiation of transcription of the DNA encoding rRNA (rDNA) in lymphosarcoma P1798 cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 718-721

Cech, T.R., Bass, B.L. (1986)
Biological catalysis by RNA.
Ann. Rev. Biochem., 55, 599-629

Cereghini, S., Piette, J., Kryszke, M.-H., Yaniv, M. (1985)
Interaction of cellular factors with the SV 40 and polyoma enhancers.
in: Eukaryotic transcription
Gluzman, Y., (Ed.)
Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor
pp. 78-85

Chaconas, G., van der Sande, J. (1980)
5`-^{32}P labelling of RNA and DNA restriction fragments.
Methods in Enzymol., 65, 75-85

Chouinard, L.A. (1975)
An electron microscope study of the intranucleolar chromatin in root meristematic cells of Allium cepa.
J. Cell Sci., 15, 645-657

Cockburn, A.F., Taylor, W.C., Firtel, R.A. (1978)
Dictyostelium rDNA consists of non-chromosomal palindromic dimers containing 5S and 36S coding regions.
Chromosoma, 70, 19-29

Coen, E.S., Dover, G.A. (1982)
Multiple pol I initiation sequences in rDNA spacers of Drosophila melanogaster.
Nucl. Acids Res., 10, 7017-7026

Corden, J., Wasylyk, B., Buchwalder, A., Sassone-Corsi, P., Kédinger, C., Chambon, C. (1980)
Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes.
Science, 209, 1306-1414

Crouch, R.J., Bachellerie, J.-P. (1986)
Ribosomal RNA processing sites.
in: DNA systematics
Vol. I: Evolution
Dutta, S.K. (Ed.)
CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida
pp. 47-80

Culotta, V.C., Sollner-Webb, B. (1985)
Purification of rRNA stable transcription complexes and identification of the required template sequences.
J. Cell. Biochem., B9, 156

Dagert, M., Ehrlich, S. (1979)
Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells.
Gene, 6, 23-28

Davie, J.R., Saunders, C.A. (1981)
Chemical composition of nucleosomes among domains of calf thymus chromatin differing in micrococcal nuclease accessibility and solubility properties.
J. Biol. Chem., 256, 12574-12580

Dawid, I.B., Brown, D.D., Reeder, R.H. (1979)
Composition and structure of chromosomal and amplified ribosomal DNA's of Xenopus laevis.
J. Mol. Biol., 51, 341-360

Dawid, I.B., Klukas, C.K., Ohi, S., Ramirez, J.L., Upholt W.B. (1976)
Structure and evolution of animal mitochondrial DNA.
in: The genetic function of mitochondrial DNA.
Saccone, C.C., Kroon, A.M., (Eds.)
Elsevier/North-Holland, Amsterdam
pp. 3-13

DeFranco, D., Schmidt, O., Söll, D. (1980)
Two control regions for eukaryotic tRNA gene transcription.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 3365-3368

Delseny, M., Cooke, R., Penon P. (1983)
Sequence heterogeneity in radish nuclear ribosomal RNA genes.
Plant Sci. Lett., 30, 107-119

Deltour, R., Gautier, A., Fakan, J. (1979)
Ultrastructural cytochemistry of the nucleus in Zea mays embryos during germination.
J. Cell Sci., 40, 43-62

Denhardt, D.T. (1966)
A membrane filter technique for the detection of complementary DNA.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 23, 641-646

DeWinter, R.F.J., Moss, T.(1986)
Spacer promoters are essential for efficient enhancement of X. laevis ribosomal transcription.
Cell, 44, 313-318

Dunaway, M., Reeder, R.H. (1985)
DNase I footprinting shows three protected regions in the promoter of the rRNA genes of Xenopus laevis.
Mol Cell. Biol., 5, 313-319

Eckert, W.A., Kaffenberger, W. (1980)
Regulation of rRNA metabolism in Tetrahymena pyriformis.
I. Nutritional shift down.
Eur. J. Cell. Biol., 21, 53-62

Egan, P.A., Levy-Wilson, B. (1981)
Structure of transcriptionally active and inactive nucleosomes from butyrate treated and control Hela cells.
Biochemistry, 20, 3695-3702

Elion, W.A., Warner, J.R. (1984)
The major promoter element of rRNA transcription in yeast lies 2 kb upstream.
Cell, 39, 663-673

Ellis, T.H.N., Goldsbrough, P.B., Castleton, J.A. (1983)
Transcription and methylation of flax rDNA.
Nucl. Acids Res., 11, 3047-3065

Favaloro, J., Treisman, R., Kamen, R. (1980)
Transcription maps of polyoma virus-specific RNA: Analysis by two-dimensional nuclease S_1 gel mapping.
Methods in Enzymol., 65, 718-749

Flavell, R.B., O`Dell, M. (1979)
The genetic control of nucleolus formation in wheat.
Chromosoma, 71, 135-152

Flavell, R.B., O`Dell, M., Thompson, W.F. (1983)
Cytosine methylation of ribosomal RNA genes and nucleolus organiser activity in wheat.
in: Kew Chromosome Conference
George Allen and Unwin, London
pp. 11-17

Flavell, R.B., O`Dell, M., Thompson, W.F., Vincentz, M., Sardana, R., Barker, R.F. (1986)
The differential expression of ribosomal RNA genes.
Phil. Trans. R. Soc. Lond., B 314, 385-397

Franke, W.W., Scheer, U. (1978)
Morphology of transcriptional units at different states of activity.
Phil. Trans. R. Soc. Lond., B 283, 333-342

Frediani, M., Forino, L.M.C., Tagliasacchi, A.M., Cionini, P.G., Durante, M., Avanzi, S. (1986)
Functional heterogeneity during early development of Phaseolus coccineus ribosomal cistrons in polytene chromosomes of embryo suspensor.
Protoplasma, 132, 51-57

Friedrich, H., Hemleben, V., Meagher, G.H., Key, J.L. (1979)
Purification and restriction endonuclease mapping of soybean 18S and 25S ribosomal genes.
Planta, 146, 467-473

Ganal, M. (1987)
Cucurbitaceen als Modellsystem zur Untersuchung von Struktur, Funktion und Evolution hochamplifizierter Genomkomponenten.
Dissertation, Tübingen

Ganal, M., Hemleben, V. (1986)
Comparison of the ribosomal RNA genes in four closely related Cucurbitaceae.
Pl. Syst. Evol., 154, 63-77

Gerstner, J. (1983)
Restriktionsenzymkartierung der Gene für 18S- und 25S ribosomale RNS aus Phaseolus aureus Roxb.
Diplomarbeit, Tübingen

Givens, J.F., Philips, R.L. (1976)
The nucleolus organizer region of maize (Zea mays L.).
Chromosoma, 57, 103-117

Grierson, D., Loening, U.E. (1974)
Ribosomal RNA precursors and the synthesis of chloroplast and cytoplasmic ribosomal ribonucleic acid in leaves of Phaseolus aureus.
Eur. J. Biochem., 44, 501-507

Grummt, I. (1981)
Specific transcription of mouse ribosomal DNA in a cell free system that mimics control in vivo.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 727-731

Grummt, I., Skinner, J.A. (1985)
Efficient transcription of a protein-coding gene from the RNA polymerase I promoter in transfected cell lines.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 722-726

Grummt, I., Maier,U., Öhrlein, A., Hassouna, N., Bachellerie, J. (1985)
Transcription of mouse rDNA terminates downstream of the 3`end of the 28S RNA and involves interaction of factors with repeated sequences in the 3`spacer.
Cell, 43, 801-810

Grummt, I., Rosenbauer, H., Niedermeyer, H., Maier, U., Öhrlein, A. (1986a)
A repeated 18 bp sequence motif in the mouse rDNA spacer mediates binding of a nuclear factor and transcription termination.
Cell, 45, 837-846

Grummt, I., Kuhn, A., Bartsch, I , Rosenbauer, H. (1986b)
A transcription terminator located upstream of the mouse rDNA initiation site affects rRNA synthesis.
Cell, 47, 901-911

Gurney, T. (1985)
Characterization of mouse 45S ribosomal RNA subspecies suggests that the first processing cleavage occurs 600 ± 100 nucleotides from the 5`end and the second 500 ± 100 nucleotides from the 3`end of a 13.9 kb precursor.
Nucl. Acids Res., 13, 4905-4919

Haltiner, M.M., Smale, S.T., Tjian, R. (1986)
Two distinct promoter elements in the human rRNA gene identified by linker-scanning mutagenesis.
Mol. Cell. Biol., 6, 227-235

Hemleben, V., Grierson, D., Dertmann, H. (1977)
The use of equilibrium centrifugation in actinomycin D-caesiumchloride for the purification of ribosomal DNA.
Plant Sci. Lett., 9, 129-135

Hemleben, V., Leweke, B., Roth, A., Stadler, J. (1982)
Organization of highly repetitive satellite DNA from two cucurbitaceae species (Cucumis melo and Cucumis sativus).
Nucl. Acids Res., 10, 631-644

Hemleben, V., Ganal, M., Gerstner, J., Schiebel, K., Torres, R.A. (1987)
Organization and length heterogeneity of plant ribosomal RNA genes.
in: Architecture of eukaryotic genes.
Kahl, G. (Ed.)
VHC, Weinheim (im Druck)

Henderson, A.S., Warburton, D., Atwood, K.C. (1972)
Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 3394-3398

Henderson, S., Sollner-Webb, B. (1986)
A transcriptional terminator is a novel element of the promoter of the mouse ribosomal RNA genes.
Cell, 47, 891-900

Hirsch, J., Martelo, O.J. (1976)
Phosphorylation of rat liver ribonucleic acid polymerase I by nuclear protein kinases.
J. Biol. Chem., 251, 5408-5413

Ho, K.-C., Stafford, D.W. (1985)
Nucleotide sequence of the transcription initiation region for rRNA in the sea urchin Lytechinus variegatus.
Gene, 39, 49-54

Iida, C.T., Kownin, P., Paule, M.R. (1985)
Ribosomal RNA transcription: proteins and DNA sequences involved in preinitiation complex formation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 1668-1672

Ingle, I., Timmis, I.N., Sinclair, I. (1975)
The relationship between satellite desoxyribonucleic acid, ribosomal nucleic acid gene redundancy, and genome size in plants.
Plant Physiol., 55, 496-501

Jorgensen, R.A., Cuellar, R.E. Thompson, W.F., Kavanagh, T.A. (1987)
Structure and variation in ribosomal RNA genes of pea.
Plant Mol. Biol., 8, 3-12

Kan, N.C., Gall, J.G. (1982)
The intervening sequence of the ribosomal RNA gene is highly conserved between two Tetrahymena species.
Nucl. Acids. Res., 10, 2809-2822

Karrer, K., Gall, J.G. (1976)
The macronuclear ribosomal DNA of Tetrahymena pyriformis is a palindrome.
J. Mol. Biol., 104, 421-453

Kavanagh, T.A., Timmis, J.N. (1986)
Heterogeneity in cucumber ribosomal DNA.
Theor. Appl. Genet., 72, 337-345

Kempers-Veenstra, A.E., v. Heerikhuizen, H., Musters, W., Klootwijk, J., Planta, R.J. (1984)
Transcription of an artificial ribosomal RNA gene in yeast.
EMBO J., 3, 1377-1382

Keshet, I., Lieman-Hurwitz, J., Cedar, H. (1986)
DNA methylation affects the formation of active chromatin.
Cell, 44, 535-543

Khan, M.S.N., Salim, M., Maden, B.E.H. (1978)
Extensive homologies between the methylated nucleotide sequence in several vertebrate ribosomal ribonucleic acids.
Biochem. J., 169, 531-542

Kidd, J.D., Glover, D.M. (1980)
A DNA segment from D. melanogaster which contains five tandemly repeated units homologous to the major rDNA insertion.
Cell, 19, 103-119

Kohorn, B.D., Rae, P.M.M. (1983)
A component of Drosophila RNA polymerase I lies within the rRNA transcription unit.
Nature, 304, 179-181

Kominami, R., Mishima, Y., Urano, Y., Sahai, M., Muramatsu, M. (1982)
Cloning and determination of the transcription termination site of ribosomal RNA gene of the mouse.
Nucl. Acids Res., 10, 1963-1979

Kownin, P., Iida, C.T., Brown-Shimer, C., Paule, M.R. (1985)
The ribosomal RNA promoter of Acanthamoeba castellanii determinated by transcription in a cell-free system.
Nucl. Acids Res., 13, 6237-6248

Kramer, R.A., Philippsen, P., Davis, R.W. (1978)
Divergent transcription in the y^ast ribosomal coding region as shown by hybridization to separated strands and sequence analysis of cloned DNA.
J. Mol. Biol., 123, 405-416

Kuo, M.T., Mandel, J.L., Chambon, P. (1979)
DNA methylation: Correlation with DNase I sensitivity of chicken ovalbumin and conalbumin chromatin.
Nucl. Acids Res., 7, 2105-2113

Kurl, R.K., Jacob, S.T. (1985)
Accurate initiation of rat ribosomal RNA gene transcription using a fractionated nuclear extract from normal liver and a hepatoma.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 1059-1063

Labhart, P., Ness, P., Banz, E., Parish, R., Koller, T. (1983)
Model for the structure of the active nucleolar chromatin.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 47, 557-564

Labhart, P, Reeder, R.H. (1984)
Enhancer-like properties of the 60/81 bp elements in the ribosomal gene spacer of Xenopus laevis.
Cell, 37, 285-289

Labhart, P. Reeder, R.H. (1986)
Characterization of three sites of RNA 3`end formation in the Xenopus ribosomal gene spacer.
Cell, 45, 431-443

Laimis, L.A., Kessel, M., Rosenthal, N., Khoury, G. (1983)
Viral and cellular enhancer elements.
in: Enhancers and eukaryotic gene expression.
Gluzman, Y., Shenh, T. (Eds.)
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
pp. 28-37

Lamb, M.M., Daneholt, B. (1979)
Characterization of active transcription units in Balbiani rings of Chironomus tentans.
Cell, 17, 835-848

Larson, R., Messing, J. (1982)
Apple II software for M 13 shotgun DNA sequencing.
Nucl. Acids Res., 10, 38-49

Lassner, M., Dvorak, J. (1986)
Preferential homogenization between adjacent and alternate subrepeats in wheat rDNA.
Nucl. Acids Res., 14, 5499-5512

Learned, R.A., Cordes, S., Tjian, R. (1985)
Purification and characterization of a transcription factor that confers promoter specifity to human RNA polymerase I.
Mol. Cell. Biol., 5, 1358-1369

Leber, B., Hemleben, V. (1979a)
Nucleosomal organization in active and inactive plant chromatin.
Plant Syst. Evol. Suppl. No. 2, 187-199

Leber, B., Hemleben, V. (1979b)
Structure of plant nuclear and ribosomal DNA containing chromatin.
Nucl. Acids Res., 7, 1263-1281

Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M., Boedtker, H. (1977)
RNA molecular weight determination by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination.
Biochemistry, 16, 4743-4751

Levinger, L., Varshavsky, A. (1982)
Selective arrangement of ubiquinated and D1 protein containing nuclesomes within the Drosophila genome.
Cell, 28, 375-385

Leweke, B., Hemleben, V. (1982)
Organization of rDNA in chromatin: Plants.
The Cell Nucleus, 11, 225-253

Long, E.O., Collins, M., Kiefer, B., Dawid, I.B. (1981)
Expression of the ribosomal DNA insertions in bobbed mutants of Drosophila melanogaster.
Mol. Gen. Genet., 182, 377-382

Maden, B.E.H., Salim, M. (1981)
The methylated nucleotide sequences in Hela cell ribosomal RNA and its precursors.
J. Mol. Biol., 88, 133-164

Maggini, F., Carmona, M.J. (1981)
Sequence heterogeneity of the ribosomal DNA in Allium cepa (Liliaceae).
Protoplasma, 108, 163-171

Mandal, R.K. (1984)
The organization and transcription of eukaryotic ribosomal RNA genes.
Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., 31, 115-160

Mandal, R.K., Dawid, I.B. (1981)
The nucleotide sequence of the transcription termination site of ribosomal RNA in Drosophila melanogaster.
Nucl. Acids Res., 9, 1801-1811

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982)
Molecular cloning.
A laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor

Martini, G., O`Dell, M., Flavell, R.B. (1982)
Partial inactivation of wheat nucleolus organisers by the nucleolus organiser chromosomes from Aegilops umbellulata.
Chromosoma, 84, 687-700

Martini, G., Flavell, R.B. (1985)
The control of nucleolus volume in wheat, a genetic study of three developmental stages.
Heredity, 54, 111-120

McDonnell, M., Simon, M., Studier, F. (1977)
Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels.
J. Mol. Biol., 110, 119-149

McMullen, M.D., Hunter, B., Phillips, R.L., Rubenstein, J. (1986)
The structure of the maize ribosomal DNA spacer region.
Nucl. Acids Res., 14, 4953-4968

McStay, B., Reeder R.H. (1986)
A termination site for Xenopus RNA polymerase I also acts as an element of an adjacent promoter.
Cell, 47, 913-920

Messing, J., Crea, R., Seeburg, P. (1981)
A system for shotgun DNA sequencing.
Nucl. Acids Res., 9, 309-321

Messing, J., Vieira, J. (1982)
A new pair of M 13 vectors for selecting either DNA strand or double-digest restriction fragments.
Gene, 19, 103-119

Miesfeld, R., Arnheim, N. (1984)
Species-specific transcription is due to promoter-specific binding factors.
Mol. Cell. Biol., 4, 221-227

Miller, K.G., Sollner-Webb, B. (1982)
Transcription of mouse ribosomal RNA genes.
The Cell Nucleus, 12, 69-100

Miller, K.G., Tower, J., Sollner-Webb, B. (1985)
A complex control region of the mouse rRNA gene directs accurate initiation by RNA polymerase I.
Mol. Cell. Biol., 5, 554-562

Moss, T. (1983)
A transcriptional function for the repetitive ribosomal spacer in Xenopus laevis.
Nature, 302, 223-228

Murray, M.G. (1986)
Use of sodium trichloracetate and mung bean nuclease to increase sensitivity and precision during transcript mapping.
Analyt. Biochem., 158, 165-170

Murtif, V.L., Rae, P.M.M. (1985)
In vivo transcription of rDNA spacers in Drosophila.
Nucl. Acids Res., 13, 3221-3240

Nomura, M., Morgan, E.A., Jaskunas, S.R. (1984)
Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components.
Ann. Rev. Biochem., 53, 75-117

Pardue, M.L. (1973)
Localization of repeated DNA sequences in Xenopus chromosomes.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 38, 475-482

Paule, M.R., Iida, C.T., Perna, P.J., Harris, G.H., Knoll, D.A., D'Alessio, J.M. (1984)
In vitro evidence that eukaryotic ribosomal RNA transcription is regulated by modification of RNA polymerase I.
Nucl. Acids Res., 12, 8161-8180

Perkowska, E., MacGregor, H.C., Birnstiel, M.L. (1968)
Gene amplification in the oocyte nucleus of mutant and wild-type Xenopus laevis.
Nature, 217, 649-650

Philippsen, P., Thomas, M., Kramer, R.A., Davis, R.W. (1978)
Unique arrangement of coding sequences for 5S, 5.8S, 18S and 25S ribosomal RNA in Saccharomyces cerevisiae as determined by R-loop and hybridization analysis.
J. Mol. Biol., 123, 387-404

Phillips, R.L., Kleese, R.A., Wang, S.S. (1971)
The nucleolus organiser region of maize (Zea mays): Chromosomal site of DNA complementary to ribosomal RNA.
Chromosoma, 36, 79-88

Prior, C.P., Cantor, C.R., Johnson, E.M., Littau, V.C., Allfrey, V.G. (1983)
Reversible changes in nucleosome structure and histone H3 accessibility in transcriptionally active and inactive states of rDNA chromatin.
Cell, 34, 1033-1042

Rigby, P., Dickmann, M., Rhodes, C., Berg, P. (1977)
Labelling desoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick-translation with DNA polymerase I.
Nucl. Acids Res., 7, 1263-1281

Ritossa, F.M., Spiegelman, S. (1965)
Localization of DNA complementary to ribosomal RNA in the nucleolus organizer region of Drosophila melanogaster.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 53, 737-745

Roche, J., Gorka, C., Goeltz, L., Lawrence, J.J. (1985)
Association of histone H1° with a gene repressed during liver development.
Nature, 314, 1033-1042

Roiha, H., Glover, D.M. (1980)
Characterization of complete type II insertions in cloned segments of ribosomal DNA of Drosophila melanogaster.
J. Mol. Biol., 140, 341-355

Rothblum, L., Reddy, R., Cassidy, B. (1982)
Transcription initiation site of rat ribosomal DNA.
Nucl. Acids Res., 10, 7345-7362

Saiga, H., Mizumoto, K., Matsui, T., Higashinakagawa, T. (1982)
Determination of the transcription initiation site of Tetrahymena pyriformis rDNA using in vitro capping of 35S pre-rRNA.
Nucl. Acids Res., 10, 4223-4235

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5476

Saragosti, S., Mayne, G., Yaniv, M. (1980)
Absence of nucleosomes in a fraction of SV 40 chromatin between the origin of replication and the region coding for the late leader RNA.
Cell, 20, 65-73

Scheer, U., Trendelenburg, M.F., Krohne, G., Franke, W.W. (1977)
Lengths and patterns of transcriptional units in the amplified nucleoli of oocytes of Xenopus laevis.
Chromosoma, 60, 147-167

Scheer, U., Kleinschmidt, J.A., Franke, W.W. (1982)
Transcriptional and skeletal elements in nucleoli of amphibian oocytes.
in: The nucleolus
Jordan, E.G., Cullis, C.A. (Eds.)
Cambridge University Press
pp. 25-42

Schiebel, K. (1984)
Klonierung und Charakterisierung der ribosomalen Gene der höheren Pflanze Vigna radiata.
Diplomarbeit, Tübingen

Schmidt, E.R., Godwin, E.A., Keyl, A.G., Israelewski, N. (1982)
Cloning and analysis of ribosomal DNA of Chironomus thummi piger and Chironomus thummi thummi.
Chromosoma, 87, 389-407

Schreier, P., Cortese, R. (1979)
A fast and simple method for sequencing DNA in the single-stranded bacteriophage M 13.
J. Mol. Biol., 129, 169-172

Shagai-Maroof, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A., Allard, R.W. (1984)
Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 8014-8018

Shen, C.J., Maniatis, T. (1980)
Tissue-specific DNA methylation in a cluster of rabbit β-like globin gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 6634-6638

Siegel, A., Kolacz, K. (1983)
Heterogeneity in pumpkin ribosomal DNA.
Plant Physiol., 72, 166-171

Skinner, J.A., Öhrlein, A., Grummt, I. (1984)
In vitro mutagenesis and transcriptional analysis of a mouse ribosomal promoter element.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 2137-2141

Smith, G. (1976)
Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossing-over.
Science, 191, 528-535

Sogo, J.M., Ness, P.J., Widner, R.M., Parish, R.W., Koller, T. (1984)
Psoralen cross-linking of DNA as a probe for the structure of active nucleolar chromatin.
J. Mol. Biol., 178, 897-919

Sollner-Webb, B., Reeder, R.H. (1979)
The nucleotide sequence of the initiation and termination sites for ribosomal RNA transcription in X. laevis.
Cell, 18, 485-499

Sollner-Webb, B., Wilkinson, J.A., Roan, J., Reeder, R.H. (1983)
Nested control regions promote Xenopus ribosomal RNA synthesis by RNA polymerase I.
Cell, 35, 199-206

Sollner-Webb, B., Miller, K.G., Tower, J., Culotta, V.C., Windle, J. (1985)
The promoter of the ribosomal RNA gene is large and contains multiple domains.
J. Cell Biochem., B9, 174

Sollner-Webb, B., Tower, J. (1986)
Transcription of cloned eukaryotic ribosomal RNA genes.
Ann. Rev. Biochem., 55, 801-830

Southern, E. (1975)
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol., 98, 503-517

Spadafora, C., Riccardi, P. (1985)
Different conformations of ribosomal DNA in active and inactive chromatin in Xenopus laevis.
J. Mol. Biol., 186, 743-758

Stahl, A. (1982)
The nucleolus and nucleolar chromosomes.
in: The nucleolus
Jordan, E.G., Cullis, C.A. (Eds.)
Cambridge University Press
pp. 1-24

Stoyanova, B.B., Hadjiolov, A.A. (1979)
Alteration in the processing of rat liver ribosomal RNA caused by cycloheximide inhibition of protein synthesis.
Eur. J. Biochem., 96, 349-356

Tague, B., Gerbi, S. (1984)
Processing of the large rRNA precursor: Two proposed categories of RNA-RNA interactions in eukaryotes.
J. Mol. Evol., 20, 362-367

Tautz, D., Dover, G.A. (1986)
Transcription of the tandem array of ribosomal DNA in Drosophila melanogaster does not determine at any fixed point.
EMBO J., 5, 1267-1273

Trendelenburg, M.F., Scheer, U., Zentgraf, H., Franke, W.W. (1976)
Heterogeneity of spacer length in circles of amplified ribosomal DNA of two insect species, Dytiscus marginalis and Acheta domestica.
J. Mol. Biol., 108, 453-470

Trendelenburg, M.F., Zentgraf, H., Franke, W.W., Gurdon, J. (1978)
Transcription patterns of amplified Dytiscus genes coding for ribosomal RNA after injection in Xenopus oocytes nuclei.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 3791-3795

Toloczyki, C., Feix, G. (1986)
Occurence of 9 homologous repeat units in the external spacer region of a nuclear maize rRNA gene unit.
Nucl. Acids Res., 14, 4969-4986

Torres-Ruiz, R.A. (1985)
Struktur, Sequenzheterogenität und Methylierung der ribosomalen RNA-Gene von Cucurbita pepo L.
Diplomarbeit, Tübingen

Tower, J., Culotta, V.C., Sollner-Webb, B. (1985)
Regulation of mouse rRNA transcription by a short-lived specific form of RNA polymerase I.
J. Cell Biochem., B9, 206

Tower, J., Culotta, V.C., Sollner-Webb, B. (1986)
Factors and nucleotide sequences that direct ribosomal DNA transcription and their relationship to the stable transcription complex.
Mol. Cell. Biol., 6, 3451-3462

Vance V.B., Thompson, E.A., Bowman, L.H. (1985)
Transfection of mouse ribosomal DNA into rat cells: Faithful transcription and processing.
Nucl. Acids Res., 13, 7499-7513

Varsanyi-Breiner, A., Gusella, J.F., Key, C., Housman, D.E. (1979)
The organization of a nuclear sequence from a higher plant: Molecular cloning and characterization of soybean ribosomal DNA.
Gene, 7, 317-334

Veldman, G.M., Klootwijk, J., deJonge, P., Leer, J.R., Planta, R.J. (1980)
The transcription termination site of the ribosomal RNA operon in yeast.
Nucl. Acids Res., 8, 5179-5192

Warner, J.R. (1977)
In the absence of ribosomal RNA synthesis, the ribosomal proteins of HeLa cells are synthesized normally and degraded rapidly.
J. Mol. Biol., 115, 315-333

Weintraub, H. (1984)
Histone H1 dependent chromatin superstructure and the suppression of gene activity.
Cell, 38, 17-25

Weintraub, H., Groudine, M. (1976)
Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation.
Science, 93, 848-856

Wellauer, P.K., Reeder, R.H., Carrol, D., Brown, D.D., Deutch, A., Higashinakagawa, T., Dawid, I.B. (1974)
Amplified ribosomal DNA from Xenopus laevis has heterogenous spacer length.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 2823-2827

Wellauer, P.K., Dawid, I.B. (1977)
The structural organization of ribosomal DNA in Drosophila melanogaster.
Cell, 10, 193-212

Whitfeld, P.R., Bottomly, W. (1983)
Organization and structure of chloroplast genes.
Ann. Rev. Plant Physiol., 34, 279-310

Wilkinson, J., Sollner-Webb, B. (1982)
Transcription of Xenopus ribosomal RNA genes by polymerase I in vitro.
J. Biol. Chem., 257, 14357-14383

Yakura, K., Kato, A., Tanifuji, S. (1983)
Structural organization of ribosomal DNA in four Trillium species and Paris verticulata.
Plant Cell Physiol., 24, 1231-1240

Yakura, K., Kato, A., Tanifuji, S. (1984)
Length heterogeneity of the large spacer of Vicia faba rDNA is due to the differing number of a 325-bp repetitive sequence elements.
Mol. Gen. Genet., 193, 400-405

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985)
Improved M 13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M 13 mp18 and pUC 19 vectors.
Gene, 33, 103-119

Lebenslauf

Name:	Jutta Maria Katharina Gerstner
Geboren:	12.2.1957 in Stuttgart
Eltern:	Dr. Alois Gerstner, Ministerialdirigent und Jutta Gerstner, geb. Kimmich, Hausfrau

Schulausbildung:

1964-1967	Österfeldschule in Stuttgart-Vaihingen
1967-1976	Fanny-Leicht-Gymnasium, Stuttgart-Vaihingen 3.6.1976 Abitur

Studium:

Sommersemester

1977	Studium der Chemie an der Universität Tübingen
1977-1979	Studium der Biologie an der Universität Stuttgart
1979-1983	Studium der Biologie an der Universität Tübingen
1982-1983	Diplomarbeit unter Anleitung von Frau Prof. Dr. V. Hemleben am Institut für Biologie II, Lehrstuhl für Genetik Thema: Restriktionskartierung der Gene für die 18S und 25S ribosomale RNS aus Phaseolus aureus Roxb.
1983-1987	Dissertation unter Anleitung von Frau Prof. Dr. V. Hemleben am Institut für Biologie II, Lehrstuhl für Genetik

Meine akademischen Lehrer waren:

Allenstein
Ammon
Bessler
Braun
Fluck
Forkmann
Gülch
Guglielmi
Haberlandt
Hantke
Hemleben
Hülser
Köhler
Kull
Kunze
Lange
Mechelke
Mecke
Meier-Brook
Möhn
Mundry
Neugebauer
Niethammer
Pick
Pinsker
Poralla
Probst
Schmitt
Seybold
Seyffert
Siess
Sperlich
Verspohl
Wehrmaker
Wenk
Wöhrmann
Zähner